

Aus dem Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock  
Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

# Genetische Kontrolle der Leukozyten- Endothelzell-Interaktion als Determinante in der Manifestation der rheumathoiden Arthritis



Dissertation  
zur  
Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock  
vorgelegt von  
Liyong Pu  
am 29.11.2012

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar  
(Universität Rostock, Institut für Experimentelle Chirurgie)
2. Gutachter: Frau Prof. Dr. Brigitte Müller-Hilke  
(Universität Rostock, Institut für Immunologie)
3. Gutachter Herr Prof. Dr. med. Axel Roers  
(Technische Universität Dresden, Institut für Immunologie)

Tag der Verteidigung: 31.07.2013

# Inhaltverzeichnis

<b><u>Zusammenfassung .....</u></b>	<b><u>5</u></b>
<b><u>Abstract .....</u></b>	<b><u>7</u></b>
<b><u>1 Einleitung .....</u></b>	<b><u>8</u></b>
1.1 Immunsystem und Autoimmunität .....	8
1.2 Rheumatoide Arthritis .....	10
1.2.1 Ätiologie .....	11
1.2.2 Genetische Aspekte .....	12
1.2.3 Pathogenese .....	13
1.3 Mausmodell für rheumatoide Arthritis: Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) .....	15
1.4 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion .....	16
1.5 Ziel der Arbeit .....	18
<b><u>2 Material und Methode .....</u></b>	<b><u>19</u></b>
2.1 Mausmodell der Kollagen-induzierten Arthritis .....	19
2.1.1 Versuchsmäuse .....	19
2.1.2 Induktion der Kollagen-induzierten Arthritis .....	20
2.2 Molekularbiologische Methoden .....	20
2.2.1 Isolierung chromosomaler DNA aus Mausschwanzbiopsien für die Mikrosatellitenanalyse .....	20
2.2.2 Genotypisierung der Mäuse mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Mikrosatellitenmarker .....	20
2.2.3 Fragmentlängenanalyse am Sequencer .....	22
2.2.4 RNA Präparation .....	23
2.2.5. Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) .....	24
2.2.6. TaqMan Real-Time Polymerase-Kettenreaktion .....	24
2.3 Intravitale fluoreszenzmikroskopische Untersuchung (IVM) .....	26
2.3.1 Prinzip der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie .....	26
2.3.2 Anästhesie und chirurgische Präparation der Versuchstiere .....	28
2.3.3 Mikrozirkulatorische Parameter .....	30

<b>2.4 Strategien zur Identifikation von Suszeptibilitätsgenen in der CIA.....</b>	<b>34</b>
2.4.1 Quantitative Trait Loci .....	34
2.4.2 Genomweite Kopplungsanalyse .....	34
<b><u>3 ERGEBNISSE.....</u></b>	<b><u>36</u></b>
<b>3.1 Ergebnisse der mikrozirkulatorischen Messung mit IVM.....</b>	<b>36</b>
3.1.1 Mikrovaskuläre Perfusion und Kapillardurchmesser .....	36
3.1.2 Blutfließgeschwindigkeit der Erythrozyten (V-RBC).....	36
3.1.3 Bestimmung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion .....	37
<b>3.2 Ergebnisse der genomweiten Kopplungsanalyse.....</b>	<b>37</b>
3.2.1 Genomweite Kopplungsanalyse in der F2-Generation .....	37
3.2.2 Identifizierung der die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in der Frühphase der CIA kontrollierenden QTLs .....	37
3.2.3 Expression der potentiell in die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion involvierten Gene .....	39
3.2.4 Identifizierung der Genexpression-kontrollierenden QTLs .....	41
<b><u>4 Diskussion .....</u></b>	<b><u>45</u></b>
<b>4.1 Diskussion der Methoden .....</b>	<b>46</b>
4.1.1 Kollagen-induzierte Arthritis .....	46
4.1.2 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie und chirurgische Präparation .....	50
4.1.3 Kopplungsanalyse .....	52
<b>4.2 Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>54</b>
4.2.1 Rolle der Mikrozirkulation in der CIA .....	54
4.2.2 Identifizierung neuer Phänotyten- und Genexpressions-QTLs .....	57
<b><u>Literaturverzeichnis.....</u></b>	<b><u>60</u></b>
<b><u>Danksagung.....</u></b>	<b><u>75</u></b>
<b><u>Erklärung.....</u></b>	<b><u>76</u></b>
<b><u>Thesen.....</u></b>	<b><u>77</u></b>

## Zusammenfassung

Die rheumatoide Arthritis stellt mit einer Prävalenz von ca. 1 % eine häufige chronisch entzündliche Gelenkerkrankung dar. Aufgrund der hohen Prävalenz hat die Erkrankung infolge ihrer enormen Kosten, die für Diagnose, Therapie, Rehabilitationsmaßnahmen sowie Arbeitsausfälle aufgewendet werden müssen, eine enorme volkswirtschaftliche Bedeutung erlangt. Die Ätiologie und Pathogenese der Erkrankung sind trotz intensiver Forschung weitgehend unklar. Ein besseres detailliertes Verständnis, insbesondere der Initiation der RA, ist Voraussetzung für die Entwicklung neuer effizienter Therapieansätze. Die meisten bis jetzt jedoch durchgeführten Untersuchungen betrachteten die Krankheit erst nach dem Auftreten klinisch manifester arthritischer Gelenkveränderungen. Die initiale Phase der Arthritisentwicklung und hierbei insbesondere die Leukozytenrekrutierung sind bisher unzureichend untersucht.

In dieser Studie konzentrierten wir uns daher auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion zu einem frühen Zeitpunkt der rheumatoiden Arthritis, d.h. vor dem Auftreten von klinischen Symptomen.

Zuerst war das Ziel der *in vivo* Studie, die synoviale Mikrozirkulation des Kniegelenkes mittels hochauflösender Multifluoreszenz-Mikroskopie bei der Kollagen-induzierten Arthritis, einem etablierten Tiermodell der rheumatoiden Arthritis, während der frühen Entwicklungsphase zu charakterisieren.

Danach wurden *in vitro* Untersuchungen durchgeführt, um genetische Faktoren zu identifizieren, welche in die Ätiologie und den Pathomechanismus der Kollagen-induzierten Arthritis involviert sind. Ausgehend von einem Merkmal-basierenden Ansatz wurden in einer Kopplungsanalyse mit 155 Mäusen einer F2-Generation aus der Kreuzung des Arthritis-suszeptiblen DBA/1J Stammes und des Arthritis-resistenten FVB/N-Stammes zuerst die chromosomalen Regionen (quantitative trait loci – QTLs) identifiziert, welche verschiedene *in vivo* Parameter (Fraktion rollender Leukozyten, adhärente Leukozyten, funktionelle kapillare Dichte, kapillarer Diameter, Velocity-RBC) der Kollagen-induzierten Arthritis kontrollieren. Die Kopplungsanalyse erbrachte 7 QTLs auf den Chromosomen 8, 9, 13, 17 und 18. Alle detektierten Loci wurden neu beschrieben und waren vorher nicht bekannt.

Zudem wurden durch diese Arbeit die Genexpressions-QTLs identifiziert, die potenziell bei der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in der Frühphase der Erkrankung involviert sind.

Die von uns untersuchten 11 Gene zeigten verschiedene Expressionslevel in der Frühphase der Kollagen-induzierten Arthritis.

In den Gelenken wurde das Expressionslevel von 6 Genen (Ccr3, Il13 $\alpha$ 1, Dfb3, Selp, Xcl1 und Tnf $\alpha$ ) durch multiple QTLs kontrolliert (Chromosome 1, 2, 6, 7, 10, 15, 16, 17).

In Lymphknoten wurde die Expression von CD44, Il13 $\alpha$ 1, CCR3 und Il1 $\beta$  von mehreren QTLs (Chromosome 1, 5, 8, 12, 15) gesteuert. Diese Arbeit ist nach unserem Kenntnis die erste Studie, die die QTL's, welche die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in der Frühphase der Kollagen-induzierten Arthritis kontrollieren, beschreibt.

## Abstract

Rheumatoid Arthritis (RA) is a common chronic systemic inflammatory disorder of the joints with a prevalence of 1%. It has a worldwide enormous economic impact because of its prevalence and high costs regarding diagnosis, therapy and rehabilitation measures. The aetiology and pathogenesis of RA are still partly unclear. Nevertheless a detailed understanding of the genesis of RA is crucial for the development of new and efficient therapies. Until now most of the studies dealing with RA consider the disorder once its clinical symptoms, like arthritic joint alterations, are manifest. The initial phase of the development of RA and especially recruitment of leukocytes are yet only marginally examined. Therefore the objective of this study concentrates on leukocyte-endothelialcell interaction in an early state of the disorder before the manifestation of clinical symptoms.

First we characterized synovial microcirculation of the knee joint in an early stage of development in collagen-induced RA in a well-established animal model by using high-resolution multifuorescence microscopy.

After that we identified genetic factors playing a role in aetiology and pathomechanism of collagen-induced RA in an in vitro study. Using a character-based approach within a linkage analysis with 155 mice of a F2-generation (a linkage of a arthritis-susceptible DBA/1J strain and arthritis-resistant FVB/N strain) we identified the different chromosomal regions (quantitative trait loci - QTLs), that control different parameters (rolling fraction, stiction, functional capillary density, capillary diameter, velocity-RBC) of collagen-induced RA. 7 QTLs were identified on chromosome 8,9,13,17 and 18. All of them are newly identified and have not been known before.

Furthermore this study identified gene expression-QTLs that are potentially involved in leukocyte-endothelialcell interaction in an early state of RA. The 11 genes reviewed in this study show different levels of expression in the early state of collagen-induced RA.

The levels of expression of 6 genes (Ccr3, Il13ra1, Dfb3, Selp, Xcl1 and Tnf $\alpha$ ) in the joints are controlled by different QTLs (Chromosome 1,2,6,7,10,15,16,17). The expression of CD44, Il13ra1, CCR3 and Il1 $\beta$  in lymph nodes is controlled by multiple QTLs (Chromosome 1,5,8,12,15).

By our knowledge this is the first study, which demonstrates controlling QTLs involved in leukocyte-endothelialcell interaction in an early phase of collagen-induced RA.

# 1. Einleitung

## 1.1 Immunsystem und Autoimmunität

Das Immunsystem dient dazu, den Körper gegen Krankheiten und andere schädigende Einflüsse zu verteidigen. Im Vergleich zur angeborenen Immunität, welche unspezifisch ist und in der Natur als „erste Verteidigung“ fungiert, verleiht die adaptive Immunität dem Menschen die Fähigkeit, auf neue externe Stimuli spezifisch zu reagieren. Das Immunsystem ist dabei fähig, diese neue Reaktion abzuspeichern. Das ist die Grundlage der Immunisierung. Sowohl die angeborenen als auch die erworbenen Immunreaktionen basieren auf Reaktionen der Leukozyten.

Die angeborene Immunantwort nutzt dabei phagozytierende Zellen, wie Neutrophile und Makrophagen, sowie Zellen, die primär sekretorisch tätig sind, z.B. Basophile, Eosinophile und Mastzellen sowie die natürlichen Killerzellen (NK Zellen).

Die erworbene Immunantwort beruht auf den antigenspezifischen B- und T-Lymphozyten, die an der Oberfläche hochvariable Rezeptormoleküle tragen. Die Rezeptormoleküle interagieren mit speziellen antigenpräsentierenden Zellen.

Moleküle, die das Immunsystem als „fremd“ und nicht Teil des „eigenen Körpers“ erkennt, werden als Antigen präsentiert. Die Exposition gegenüber solchen Antigenen regt eine Immunantwort an. Die von aktivierten B-Zellen produzierten Immunglobuline binden Pathogene oder ihre toxischen Produkte in extrazellulären Räumen des Körpers. Solche durch diese Antikörperbindung markierten Krankheitserreger werden durch Phagozyten und das Komplementsystem erkannt und zerstört. T-Zellen spielen eine entscheidende Rolle in der Aktivierung von B-Zellen zur Antikörperproduktion und aktivieren Makrophagen zur Immunabwehr. Dabei binden T-Zell-Rezeptoren nur Peptide, die auf der Zelloberfläche, gebunden an ein MHC-Molekül („major histocompatibility complex“), präsentiert werden. So können intrazelluläre Pathogene, wie Viren oder Bakterien, erkannt werden, wenn die infizierten Zellen auf ihrer Oberfläche Peptide präsentieren, die aus Proteinen von Krankheitserregern stammen (Delves et al, 2000a/b; Janeway et al, 2002).

Durch die positive und negative Selektion im Thymus lernen die T-Zellen das Erkennen der Histokompatibilitätskomplex (MHC)-Moleküle und körpereigener Antigene. Während der positiven Selektion werden sie auf Selbst-MHC-Restriktion geprüft. Das bedeutet, es beteiligen sich nur diejenigen T-Zellen an der adaptiven Immunantwort, die körpereigene MHC-Moleküle als harmlos erkennen. Die Zellen, die von dendritischen Zellen oder



Makrophagen aus dem Mark präsentierte körpereigene Peptide erkennen, werden durch Apoptose negativ selektiert und zerstört.

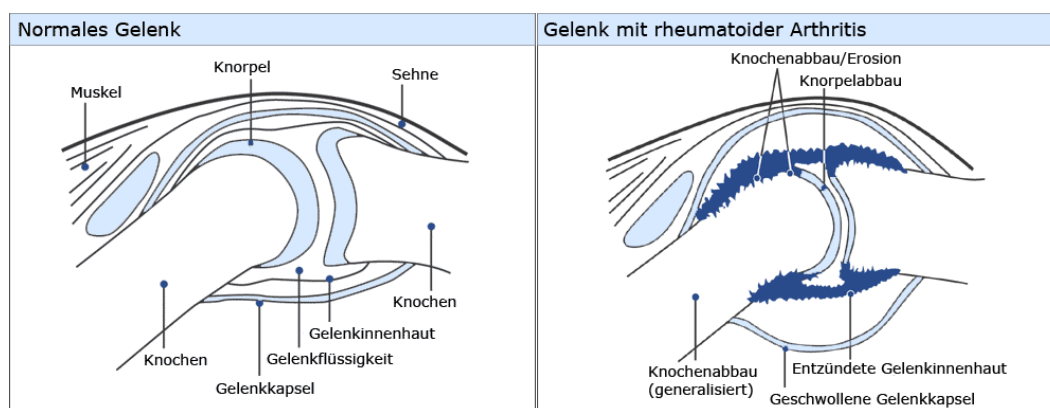
Die Population der positiv selektierten Zellen enthält auch solche, deren Rezeptoren einen MHC-Peptid-Komplex überproportional stark binden, sogenannte potentiell autoreaktive T-Zellen. Zur Inaktivierung der potentiell autoreaktiven T-Zellen gibt es eine Vielzahl von Mechanismen. Als erstes Beispiel ist die klonale Deletion zu nennen, durch die derartigen Zellen mittels Apoptose eliminiert werden (Kappler et al, 1987; Nossal et al, 1994; Robey and Fowlkes, 1994). Die klonale Deletion von autoreaktiven Lymphozyten ist für die Selbsttoleranz des Organismus wichtig. Zweitens kann die Bindungsaffinität gegenüber dem Selbstantigen entweder durch V(D)J-Rekombination oder durch somatische Hypermutation reduziert werden (Nemazee und Hogquist, 2003). Die dritte Möglichkeit zur Regulation der Autoreaktion ist die klonale Anergie. Es geht um einen intrinsischen Regulationsmechanismus, welcher die Aktivierungsfähigkeit von autoreaktiven T-Zellen verringert (Healy und Goodnow, 1998).

Trotz diesen Mechanismen versagt in einigen Fällen die Selbsttoleranz. Allgemein wird dies Autoimmunkrankheit genannt, bei der eine spezifische Immunantwort gegen körpereigene Antigene ausgelöst wird. 3-8% der Bevölkerung weltweit und ca. 5% in Europa und Nordamerika sind von der Autoimmunkrankheit betroffen. Obwohl die autoimmunen Erkrankungen, und besonders der Schritt der Initiation, intensiv erforscht wurden, bleiben die Mechanismen zu deren Entstehung aber weitgehend unbekannt. Bekannt ist, dass Autoimmunerkrankungen multifaktorielle Ursachen haben. So sind an der Entstehung von Autoimmunkrankheiten v.a. genetische Prädispositionen beteiligt, wie z.B. HLA-Assoziation oder eine geschwächte immunregulatorische Kontrolle. Bestimmte Umweltfaktoren spielen auch eine wichtige Rolle, wie z.B. mikrobielle Infektionen. Weiterhin ist der Prozess „des molekularen Mimikries“ zu nennen, bei dem ein Antigen eines Mikroorganismus einem körpereigenen Antigen ähnelt und so eine kreuzreaktive Autoimmunantwort induzieren kann (Oldstone et al, 1999).

Autoimmune Funktionsstörungen umfassen mehr als 50 Krankheiten und Syndrome (Persidis 1999). Dabei unterscheidet man abhängig vom Vorkommen der autoimmunen Reaktionen zwischen organspezifischen Krankheiten, wie z.B. dem primären Insulin-abhängigen Diabetes mellitus, bei der das endokrine Pankreas betroffen ist, und systemischen Autoimmunerkrankungen, wie z.B. dem Lupus erythematosus und der rheumatoiden Arthritis, in deren Verlauf sich die Entzündung in mehreren Geweben ausbreitet. Für unsere Studie wird im Folgenden die rheumatoide Arthritis näher beschrieben.

## 1.2 Rheumatoide Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch-entzündliche Systemerkrankung, die durch die Synovialitis zu Arthritis, Bursitis und Tendovaginitis führt (Abb. 1-1). Fakultativ kann es zu extraartikulären Organmanifestationen kommen. Hierbei können Vaskulitiden, subkutane oder subperiostale Knoten ebenso wie Muskelatrophien, Leukopenien, Splenomegalien und Lymphadenopathien entstehen.



**Abb. 1-1** : Morphologische Gelenkveränderungen bei der RA. Normales Gelenk (links) und Gelenk mit rheumatoider Arthritis (rechts); immunologie.hexal.de

Die RA kann Menschen aller Altersgruppen betreffen. In Deutschland leiden 0,5 bis 1% der Bevölkerung an RA. Insbesondere im Alter zwischen 30 und 50 Jahren zeigt sich eine Häufung. Die RA ist bei Erwachsenen die häufigste entzündliche Erkrankung der Gelenke und tritt bei Frauen zwei- bis dreimal so häufig wie bei Männern auf, was für eine Beteiligung der Geschlechtshormone spricht (Feldmann et al. 1996).

Es wurde berichtet, dass eine Östrogen-Ersatz-Therapie das Risiko bei Frauen, an RA zu erkranken, senken konnte (Spector et al, 1990; Jansson et al, 1998). Seltener kommen Erkrankungen im Kindesalter vor und auch im höheren Lebensalter kann eine RA erstmals auftreten.

Der Krankheitsverlauf ist vielseitig. Ein schubweiser Verlauf mit fortschreitenden Veränderungen an Gelenken und Knochen ist möglich. Es wird aber auch Fälle mit vollständiger Rückbildung der Krankheitszeichen beschrieben.

Die RA wird auch als chronische Polyarthritis (CP) bezeichnet, weil diese Erkrankung üblicherweise in mehreren Gelenken auftritt. Die RA beginnt meist symmetrisch an den

kleinen Gelenken besonders der Finger und schreitet zentripetal fort. Nicht betroffen werden bei der RA die distalen Interphalangealgelenke II-V, BWS und LWS.

Anfänglich besteht Bewegungsschmerz und Schwellung der Fingergrund- und proximalen Interphalangealgelenke. Ein Händedruck führt zum typischen Querdruckschmerz, dem Gaenslen-Zeichen. Im akuten Entzündungsschub kann es zu Gelenkergüssen kommen. Morgendliche Steifigkeit und Durchblutungsstörungen einzelner Finger sind Frühsymptome. Im späteren Stadium kommt es als Folge der Knorpel- und Knochenzerstörung schließlich zur Deformation der Gelenke. Die klinischen Symptome sind je nach dem betroffenen Gewebe stark variant. Eine klare Diagnose ist daher häufig sehr schwierig zu stellen. Um die Diagnosefindung zu erleichtern, hat das American College of Rheumatology 1987 folgende sieben Kriterien festgelegt, von denen mindestens 4 über einen Mindestzeitraum von 6 Wochen zutreffend sein müssen (Arnet et al, 1988):

- Morgensteifigkeit der Gelenke von mindestens 1 h Dauer
- Arthritis von 3 oder mehr Gelenkbereichen: Weichteilschwellung oder Erguss gleichzeitig an mindestens 3 Gelenkbereichen
- Arthritis der Hand- oder Fingergelenke: Schmerzen + Schwellungen von Handwurzelgelenken, proximalen Interphalangealgelenken (PIP) oder Metakarpophalangealgelenken (MCP)
- Symmetrische Arthritis: Gleichzeitiger Befall desselben Gelenkbereiches beider Körperhälften
- Rheumatoide Knoten: Subkutane Knoten über Knochenvorsprüngen oder Extensorflächen oder im juxtaartikulären Bereich
- Nachweis von Rheumafaktoren im Serum
- Typische Röntgenveränderungen der Hände: Gelenknahe Osteoporose u./o. Erosionen (osteoarthrotische Veränderungen allein sind nicht ausreichend)

### 1.2.1 Ätiologie

Die Ätiologie der RA ist zwar intensiv erforscht worden, bleibt aber weitgehend ungeklärt. Eine multifaktorielle Genese wird vermutet. So liegt bei der RA eine deutliche familiäre Häufung vor und die Existenz der genetischen Prädisposition konnte bereits früh durch Zwillings-Assoziationsstudien nachgewiesen werden. Hier fand man eine erhöhte Konkordanzrate bei eineiigen Zwillingen von 12 bis 30 % (Aho et al, 1986). Welche

genetische Strukturen aber genau für die Entstehung der RA wichtig sind, bleibt immer noch unklar.

Die kritischen Umweltfaktoren zur Entstehung der RA sind zum Beispiel das Übergewicht und das Rauchen (Symmons et al, 1997). Das Rauchen ist nicht nur ein Risikofaktor bei der Entstehung der RA, sondern auch ein Faktor, der die Schwere der Erkrankung beeinflusst. Denn Raucher benötigen im Falle einer Erkrankung durchschnittlich mehr und intensivere medikamentöse Behandlungen als ein Nicht-Raucher, der unter RA leidet. Und wesentlich mehr Raucher als Nichtraucher sind trotz stärkerer Therapie nicht beschwerdefrei. Schließlich können hormonelle Einflüsse ebenso eine kritische Rolle in der Entstehung der RA spielen. Studien zur Rolle von Östrogen erklären die unterschiedliche Prävalenz der Geschlechter, bei der Frauen häufiger als Männer betroffen sind. Zudem führt eine Schwangerschaft zu einer Verbesserung der RA (Jansson et al, 1998; Spector et al, 1990).

Virale oder bakterielle Infektion können anscheinend ebenfalls eine RA induzieren, solange es sich um genetisch prädisponierte Personen handelt (Silman et al, 1993). Als potenzielle Auslöser wurden zum Beispiel das Epstein-Barr Virus oder retrovirale Erreger angenommen (Spector et al, 1990; Moreland et al, 1991). Eine chronische persistierende Lyme-Arthritis, die durch das Bakterium *Borrelia burgdorferi*-Infektion ausgelöst wird, scheint ebenfalls ein analoger Auslöser zu sein (Steere et al, 2001).

Nach dem Prinzip des o.g. „molekularen Mimikrie“ könnten die viralen bzw. bakteriellen Proteine (= körperfremd-Antigen) die körpereigenen Gewebebestandteile (= Autoantigen) nachahmen, so dass es zur „Kreuzreaktion“ kommt. Dies führt zur Antikörperbildung und T-Zellaktivierung und somit zur systemischen Entzündung (Oldstone et al, 1987).

### 1.2.2 Genetische Aspekte

Bereits 1976 hatte Stastny experimentell eine genetische Gemeinsamkeit zwischen nicht verwandten RA-Patienten zeigen können, die später zur Entdeckung weiterer HLA-Gene führte, welche im MHC („*major histocompatibility complex*“) angesiedelt und an der Antigenpräsentation beteiligt sind (Stastny, 1976). Eine Assoziation zwischen dem HLA-DR4-Locus und der RA wurde schon 1978 erstmalig beschrieben (Stastny et al, 1978). Bis zu 70% der RA-Patienten haben das HLA-Antigen DR4 (Häufigkeit bei Gesunden ca. 25%). DR4-homozygote-Patienten haben oft einen schweren (erosiven) Krankheitsverlauf.

Dazu ist HLA-DR4 mit anderen Autoimmunerkrankungen (wie systemische Sklerose oder SLE) assoziiert. So wurde 1987 die Hypothese des „share an epitope“ von Gregersen et al,

gestellt (Batchelor et al, 1980, Szücs et al, 2007). Leider ist dieses Ergebnis nur begrenzt gültig, da es anscheinend nur auf die Kaukasier zutrifft. So konnten in der Studie von McDaniel und Mitarbeitern, bei 2/3 der untersuchten an RA erkrankten Afroamerikaner kein für das rheumatoide Epitop kodierendes Allel gefunden werden. Daneben gibt es auch Personen mit dieser genetischen Prädisposition, die trotzdem nicht an RA erkranken.

Es wurden auch andere HLA-Loci (HLA-DR1, HLA-DR10, HLA-DRw6, HLA-DRB1) und weitere Gene identifiziert, die eine deutliche Assoziation zur RA aufweisen, wie zum Beispiel SLC22A4 (solute carrier family 22, member 4) auf dem Chromosom 5q31 und der regulierende Transkriptionsfaktor RUNX1 (Runt-related transcription factor 1), PADI4 (peptidyl arginine deiminase, type IV) sowie PTPN22 (protein tyrosine phosphatase N22) und FCRL3 (FC receptor-like 3). SLC22A4 dient als Transporter für organische Moleküle in lymphatischen Organen (Tokuhiro et al, 2003). PADI4 gehört zu einer Gruppe von Peptidylarginindeiminasen, welche die Produktion von zitrullinierten Peptiden erhöhen können. Diese zitrullinierten Peptide üben eine Autoantigen-ähnliche Wirkung aus und wurden als bekanntes Ziel RA-spezifischer Autoantikörper beschrieben (Suzuki et al, 2003).

### 1.2.3 Pathogenese

Pathogenetisch ist die RA durch eine chronische Entzündung der Synovialmembran mit Infiltration von aktivierten “blood-derived“ Zellen charakterisiert. Dabei sind hauptsächlich T-Zellen, Makrophagen und Plasmazellen aktiv (Janossy et al, 1981; Cush und Lipsky et al, 1988). Es kommt dadurch zu einer zunehmenden Neovaskularisation sowie zu einer Verdickung des Synovialis-Pannus, welche durch Invasion von makrophagenähnlichen Zellen (Typ A-Synoviazysten) sowie durch Proliferation von fibroblastenähnlichen Zellen (Typ B-Synoviazysten) verursacht wird. Als ein weiterer besonderer Zelltyp präsentiert sich bei der RA der Pannozyt, der an der Grenze des Knorpels vorkommt und den Pannus bildet. Er besitzt sowohl die Eigenschaften von Fibroblasten als auch von Chondrozyten (Firestein 1996). Der Pannus überwuchert den Knorpel und zerstört ihn oft unaufhaltsam („tumor like proliferation“).

Die Neovaskularisation wird durch die Überexpression von angiogenen Faktoren, wie dem vaskulären Endothelwachstumsfaktor (VEGF), gefördert, der eine Proliferation und Migration von synovialen Endothelzellen veranlasst (Cunnane et al, 1998). Aber die ursächlichen Auslöser dieser pathogenetischen Veränderungen sind weitgehend unbekannt.

Es wird vermutet, dass das innere Immunsystem durch Toll-like-receptor (TLR)-Antagonisten, wie Proteoglycane oder bakterielle DNA, aktiviert wird und dieser Mechanismus in der Pathogenese der RA eine entscheidende Rolle spielt und somit den synovialen Entzündungsprozess fördert (Firestein 2003; Van der Heijden et al, 2000). Die durch TLR-Liganden aktivierten synovialen, dendritischen Zellen können T-Zellen in den Th1 Phänotyp umwandeln. T-Helferlymphozyten ( $CD\ 4^+$ ) können in Th1- und Th2-Zellen unterschieden werden. Th1 Zellen produzieren die pro-inflammatorischen Mediatoren, wie IL-2 und  $IFN\ \gamma$ . Dagegen produzieren Th2 Zellen IL-4, welches eine anti-inflammatorische Wirkung ausübt (Mosmann und Coffmann, 1989).

Chemokin-Rezeptoren, wie zum Beispiel *CCR5*, fördern eine Wanderung dieser autoreaktiven Th1-Zellen zu den synovialen Geweben. In der synovialen Deckzellschicht befinden sich die meisten synovialen Makrophagen. Sie sind im aktivierten Zustand die Hauptproduktionszentren von Zytokinen und leisten den größten Beitrag zur Gelenkzerstörung. Ihre Fähigkeit als antigenpräsentierende Zellen (APCs) zu agieren, wird durch die erhöhte Expression von HLA-DR erklärt (Ridley et al, 1990). Darüber hinaus besitzen synoviale Makrophagen die Eigenschaften, Th1-T-Zellen zu aktivieren und zu polarisieren (Frucht et al, 2000). Diese Vorgänge führen zu den Veränderungen des Zytokinmusters im Gelenk und einem Ungleichgewicht zwischen Matrixaufbau und -abbau, welches sich letztlich in charakteristischen Knorpel- und Knochenerosionen äußert.

Weitergehend spielt die Aktivierung von Protoonkogenen und eine dadurch verursachte Fehlregulation des Zellzyklus in der Pathogenese der RA eine wichtige Rolle. In RA Synoviozyten zeigt sich eine signifikante Erhöhung des „early growth response Gens“ (*egr-1*), welches auch die Expression anderer Onkogene reguliert (Trabandt et al, 1992a/b). In unterschiedlichen Studien wurden weitere überexprimierte Onkogene wie *c-fos*, *c-myc*, *ras*, *jun* und *fos* (AP-1) im RA-Synovium gefunden. Sie könnten ebenfalls wesentlich am Entzündungsprozess beteiligt sein, indem sie gewebezerstörende Enzyme, wie Kollagenasen, Kathepsine und Matrixmetalloproteinasen, aktivieren (Schonthal et al, 1988; Trabandt et al, 1992b; Trabandt et al, 1990; Joseph et al, 1987; Lafyatis et al, 1990). Solche Protoonkogene führen zu einem Ungleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose der synovialen Zellen und anschließend zur Transformation und dem tumorartigen Wachstum der Synoviozyten. Als Folge kommt es schließlich zur Gelenkzerstörung.

Trotz der geschilderten detaillierten Forschungsergebnisse bleiben immer noch Unklarheiten über die kausalen Zusammenhänge und die exakte Pathogenese der RA. Die Analyse wird durch die Heterogenität der humanen Population und erhebliche Variabilität an

Umweltfaktoren behindert. Daher bietet der Einsatz von Inzuchttier-Modellen zur weiteren genetischen Untersuchung der polygenen Erkrankung eine neue hervorragende Möglichkeit, da die Tiere in einer kontrollierten Umgebung leben und die genetische Diversität deutlich reduziert wird.

### **1.3 Mausmodell für rheumatoide Arthritis: Kollagen-induzierte Arthritis (CIA)**

Für die der humanen RA ähnliche Gelenkentzündung am Tier sind in der Literatur zahlreiche Modelle an Mäusen, Ratten und auch Kaninchen beschrieben. Das am häufigsten eingesetzte und am besten charakterisierte Tiermodell der RA ist die Kollagen-induzierte Arthritis („collagen-induced arthritis“, CIA) im Mausmodell. Dieses Modell zeigte dabei sowohl klinische als auch histologische Analogien zur menschlichen Autoimmunerkrankung.

1977 wurde erstmals die CIA als ein die RA simulierendes Modell mit einer autoimmunen Antwort auf Kollagen Typ II (CII), was ein wichtiger Bestandteil von Gelenkknorpel ist, von Trentham et al. in Ratten beschrieben (Trentham et al, 1977). Die Ratten wurden mit homologem und heterologem Kollagen II in KFA (komplettem Freund's Adjuvans) oder IFA (inkomplettem Freund's Adjuvans) immunisiert. Dieses Modell wurde Jahre später auf Mäuse übertragen (Courtenay et al, 1980; Rosloniec et al, 1998; Rosloniec et al, 1997).

Die CIA ist ein bezüglich der klinischen und histopathologischen Veränderungen bei humaner rheumatoider Arthritis sehr ähnliches Modell. Ca. 3-4 Wochen nach der Immunisierung mit Kollagen II/KFA entwickelt sich explosiv eine ausgeprägte Polyarthritis der peripheren Gelenken, welche progredient an Schweregrad zunimmt. In ca. 2 Wochen wird eine chronische Phase erreicht (Jeff et al, 2001). Wie die RA ist die CIA durch eine mononukleäre Zellinfiltration, Hyperplasie der Synovialzellen, Vaskularisation, Pannusbildung, Knorpel- und Knochenzerstörung sowie Ankylose und Deformation eines oder mehrerer Gelenke charakterisiert (Courtenay et al, 1980; Trentham et al, 1977).

Darüber hinaus lassen sich auch im Tiermodell Rheumafaktoren nachweisen (Holmdahl et al, 1990; Stuart et al, 1985). Allerdings liegt im Gegensatz zur RA bei der Kollagen-induzierten Arthritis die Inzidenz bei männlichen Mäusen höher als bei weiblichen Mäusen (Jasson et al, 1989 und 1998; Holmdahl et al, 1985).

Die Immunisierung mit CII verursacht eine humorale und zelluläre Immunantwort, die gegen Antigene gerichtet ist, die hauptsächlich auf dem Gelenkknorpel lokalisiert sind. Wie in zahlreichen Studien dargestellt wurde, sind die CII-reaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen als primärer Mediator der Entzündungsinduktion sowie die Produktion komplementfixierender anti-CII

Autoantikörper durch B-Zellen die Hauptmechanismen der Immunantwort (Holmdahl et al, 1990a; Holmdahl et al, 1990b; Seki et al, 1988; Wooley et al, 1981). Darüber hinaus spielen die  $CD8^+$  T-Zellen eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der CIA. So zeigte sich eine geringere Anfälligkeit bei  $CD8^+$  T-Zellen-defizienten DBA/1J Mäusen (Tada et al, 1996). Bei Tieren ohne diese Defizienz konnte durch Gabe von anti- $CD8^+$ -Antikörper eine deutliche Verzögerung des Krankheitsausbruchs erreicht werden (Arai et al, 1996). Außerdem wurde auch die Wichtigkeit von  $\alpha\beta$ -T-Zellen in der Pathogenese von CIA gezeigt. So sind Mäuse ohne  $\alpha\beta$ -T-Zellen gegen CIA komplett resistent (Corthay et al, 1999). Weiterhin zeigt sich bei der Behandlung mit anti-TCR  $\alpha\beta$ -monoklonalen Antikörpern eine signifikante Reduktion der Inzidenz der CIA (Maeda et al, 1994; Moder et al, 1992).

Wie auch bei der RA sind bei der Entstehung der CIA bestimmte genetische Faktoren involviert. Die Suszeptibilität für CIA ist eindeutig mit dem MHC-II Molekül assoziiert und basiert auf der Fähigkeit der MHC Klasse-II-Moleküle, spezifische Peptide zu präsentieren, welche die arthritiserregenden CII-reaktiven T-Zellen aktivieren.

#### **1.4 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion**

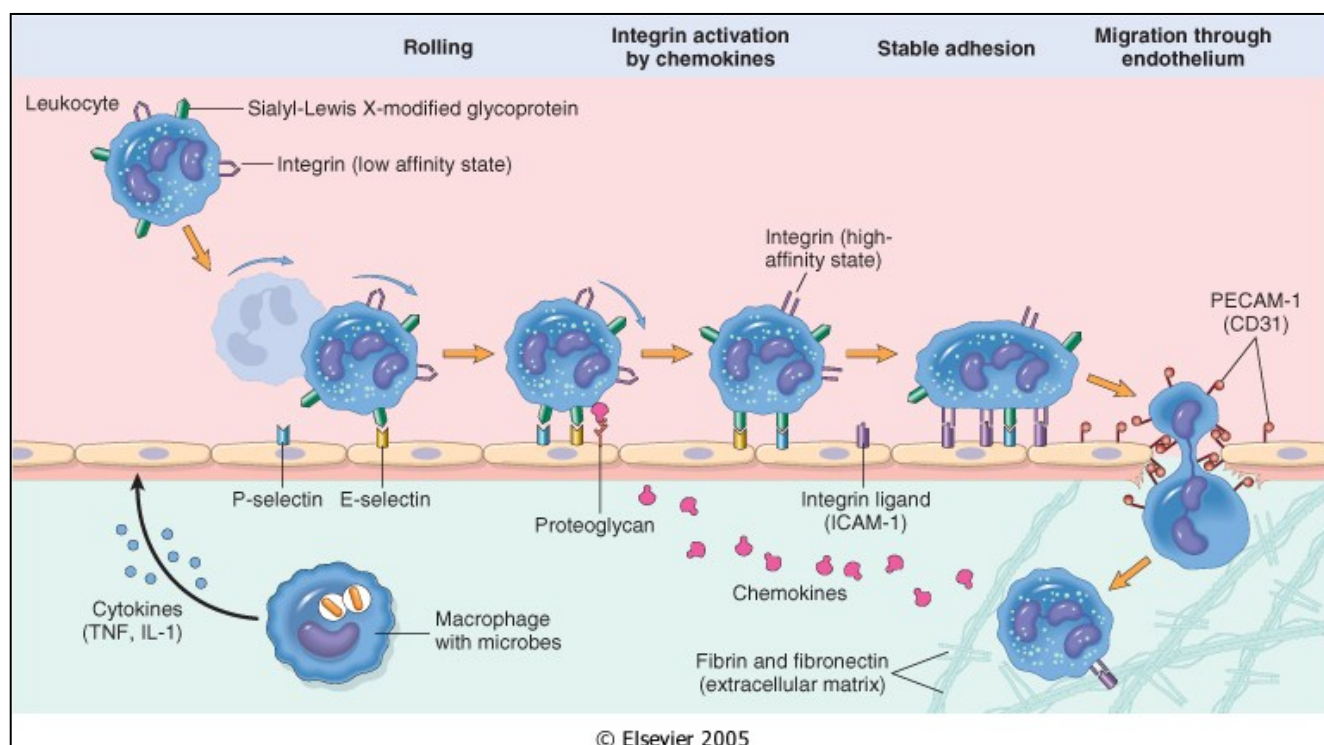
Die Aktivierung von zirkulierenden Leukozyten und ihre Interaktion mit dem Endothel mit anschließender transendothelialer Migration und Infiltration der Leukozyten ins Gewebe ist der erste und entscheidende Schritt in einer komplexen Abfolge von Prozessen der Gewebeschädigung.

Bei hohen Fließgeschwindigkeiten befinden sich Leukozyten aufgrund ihrer hohen Teilchengröße annähernd in der Gefäßmitte, der sogenannten zentralen Linie (Harell et al, 1979). Im Gegensatz dazu werden die Leukozyten bei niedrigen Fließgeschwindigkeiten (wie im entzündlichen Gewebe) in die Randbereiche des Gefäßquerschnittes abgedrängt (Bagge und Karlsson, 1980). Die dann in den Gefäßrandbereich verdrängten Leukozyten haben eine noch niedrigere Fließgeschwindigkeit als die verbliebenen Zellen im Zentralstrom, was eine verlängerte Kontaktzeit mit dem Endothel bedeutet (Caro et al, 1978; Gaehtgens et al, 1985). Damit wird die sogenannte Adhäsionskaskade in Gang gesetzt, der die feste Adhärenz der Leukozyten am Endothel und schließlich die Emigration der Leukozyten aus dem Intravasalraum ins Gewebe folgen (Butcher, 1991; Hogg und Berlin, 1995; Springer, 1990; von Andrian et al, 1993; Muller, 2003; Weber, 2003).



Das als Leukozyten-Rolling beschriebene Prinzip wird durch die Interaktion von Adhäsionsmolekülen (siehe Abb. 1-2) der Selektin-Familie, d.h. dem von Lymphozyten, Monozyten und PMN („polymorphonuclear leukocyte“, neutrophiler Granulozyt) exprimierten L-Selektin (CD62L) und den von Endothelzellen exprimierten E- (CD62E) und P-Selektin (CD62P), mit deren Liganden befördert (Alon et al, 1995; Abbassi et al, 1993; Arbones et al. 1994; Ley et al, 1995).

**Abb. 1-2:** Schematische Darstellung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion (ELSEVIER 2005)



Dabei können die Leukozyten sowohl parazellulär (Carman und Springer et al, 2004) als auch transzellulär (Feng et al, 1998; Carman und Springer et al, 2004) in das interstitielle Gewebe eindringen.

PECAM-1 war das erste dokumentierte endotheliale Zellkontaktprotein, das im Prozess der transendothelialen Migration involviert ist. Sowohl Antikörper gegen PECAM-1 als auch PECAM-Fc Fusionsproteine können die transendotheliale Diapedese von Leukozyten in vitro und in vivo blockieren (Muller et al, 1993; Vaporciyan et al, 1993).

Wie wir in unseren früheren Studien zeigen konnten, ist CD44 ein weiteres Molekül, welches an der Entwicklung der Arthritis beteiligt ist, dessen genaue Rolle jedoch noch nicht

vollständig entschlüsselt ist (Naor et al, 2003; Szántó et al, 2004).

Veihelmann et al. zeigte eine hohe Zahl an adhärenenten Leukozyten zum Zeitpunkt der klinischen Manifestation von Antigen-induzierter inflammatorischer Arthritis bei Mäusen, unabhängig von der akuten, intermediären oder chronischen Phase der Erkrankung. Darüber hinaus zeigte Gierer et al. (eigene Arbeitsgruppe), dass eine Leukozyten-Adhäsion bereits nachweisbar ist, auch wenn klinische Symptome noch fehlen. Dieser Befund akzentuiert, dass die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion ein wesentlicher Bestandteil der Einleitung, Ausbreitung und Chronifizierung der Krankheit darstellt.

## **1.5 Ziel der Arbeit**

Die RA hat einen polygenen Ursprung und gehört zu den komplexen Erkrankungen. Ein besseres detailliertes Verständnis insbesondere zur Initiation der RA ist die Voraussetzung für die Entwicklung neuer effizienter Therapiesansätze.

In der vorliegenden Arbeit sollten durch das etablierte Mausmodell der CIA die genetischen Faktoren identifiziert werden, die in der Frühphase der CIA involviert sind.

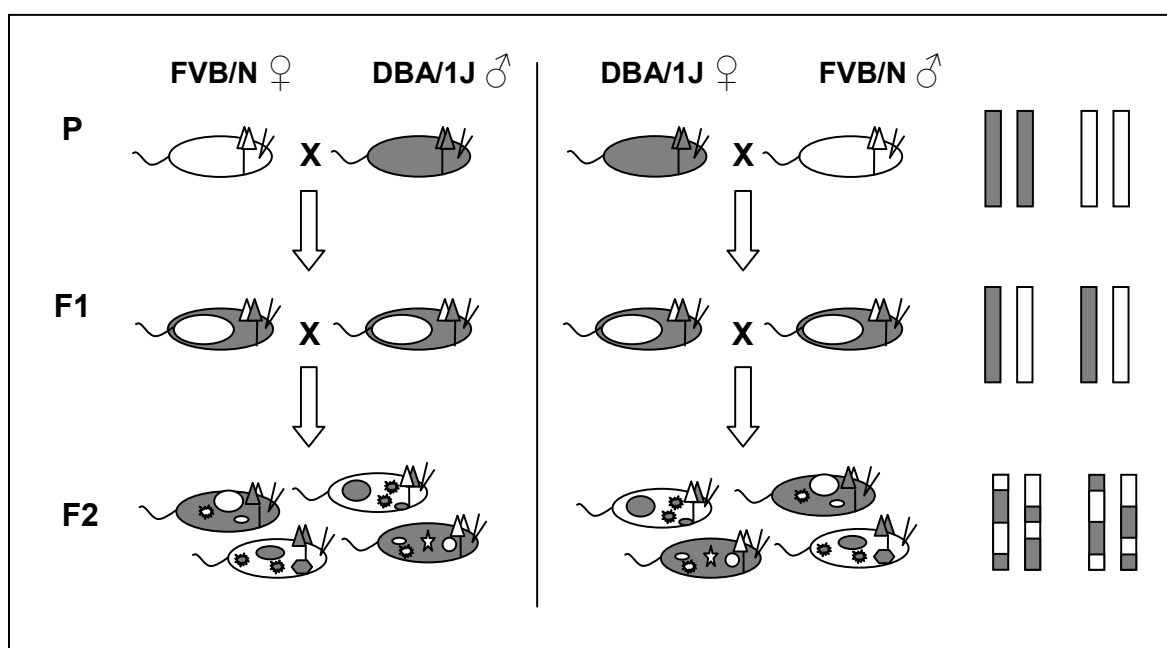
Dazu wurde ein Merkmal-basierender Ansatz genutzt. Ausgehend von bestimmten Phänotypen der Krankheit sollten Genbereiche lokalisiert werden. In einer genomweiten Kopplungsanalyse einer F2-Generation sollten zunächst merkmalsassoziierte Genbereiche (quantitative trait loci = QTLs) außerhalb des MHC-Locus identifiziert werden. Die Phänotypen wurden mittels Intravitalfluoreszenzmikroskopie quantitativ untersucht. Zudem sollten die QTLs identifiziert werden, welche die Expression von Genen kontrollieren, die bei der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion im frühen Stadium der Arthritis eine Rolle spielen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Mausmodell der CIA

#### 2.1.1 Versuchsmäuse

In der vorliegenden Arbeit wurden als Parentalstämme der Arthritis-empfindliche Mausstamm DBA/1J (MHC-2<sup>q</sup>) sowie der Arthritis-resistente Mausstamm FVB/NJ (MHC-2<sup>q</sup>) verwendet. Beide Stämme wurden von „The Jackson Laboratory“ (Bar Harbor, ME) bezogen. Für die genomweite Kopplungsanalyse wurde zunächst durch Einkreuzen beider Parentalstämme eine F1- und anschließend durch erneutes Einkreuzen der F1-Nachkommen eine F2-Generation generiert (siehe Abb. 2-1).



**Abb. 2-1:** Darstellung der Kreuzungsstrategie zur Generierung der F2-Population für die F2-Kopplungsanalyse

Die Tierhaltung erfolgte gemäß den Standardbedingungen in der Zentralen Versuchstierhaltung des Instituts für Experimentelle Chirurgie, der Universität Rostock.

Die Mäuse wurden nach den Experimenten durch thorako-zervikale Dislokation getötet. Alle Tierversuche wurden durch die Landestierschutzkommission Mecklenburg-Vorpommern, Deutschland, genehmigt.

### **2.1.2 Induktion der CIA**

Um eine CIA auszulösen, wurden 8-12 Wochen alte F2-Mäuse mit 125 µg Rinderkollagen II immunisiert. Dazu wurden 2,5 mg/ml Rinderkollagen II (Chondrex, Washington) in 0,1 N Essigsäure gelöst und mit dem gleichen Volumen an komplettem Freund'schem Adjuvans (KFA), welches 4 mg/ml Mycobacterium tuberculosis (Difco, Karlsruhe) enthielt, emulgiert. Es wurden jeder Maus 100 µl der Emulsion intradermal am Schwanzansatz injiziert (Einmal-Injektions-Kanüle, 0,45x25 mm, B/Braun). 3 Wochen nach der Immunisierung, also kurz vor dem Ausbruch der Erkrankung, wurden die Mäuse mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

## **2.2 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.1 Isolierung chromosomaler DNA aus Mausschwanzbiopsien für die Mikrosatellitenanalyse**

Die Methode zur Isolierung chromosomaler DNA für die Mikrosatellitenanalyse ist an das Protokoll von Laird et al. angelehnt (1991). Dazu wurde mit einem sterilen Skalpell ein ca. 1cm großes Stück von der Schwanzspitze der Mäuse abgeschnitten und in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Die Schwanzprobe wurde mit 600 µl 50 mM Natriumhydroxid versetzt und für ca. 2 h bei 95°C und gelegentlichem Schütteln inkubiert. Zur Neutralisation wurden anschließend 60 µl einer 1 M Tris-HCL-Lösung (pH=8) hinzugegeben und erneut geschüttelt. Die DNA-Lösung wurde mit 500 µl HPLC-H<sub>2</sub>O verdünnt und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

### **2.2.2 Genotypisierung der Mäuse mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) und Mikrosatellitenmarker**

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte mittels PCR. Die PCR ermöglicht die Identifizierung bestimmter kurzer DNA-Abschnitte. Dabei können DNA-Abschnitte, die durch Primer flankiert werden, beliebig amplifiziert werden, um die gesuchten DNA-Sequenzen sichtbar zu machen.

Zur Genotypisierung der Mäuse für die genomweite Kopplungsanalyse der F2-Generation wurden informative Mikrosatellitenmarker verwendet. Mikrosatelliten sind kurze, nicht kodierende DNA-Sequenzen, die im Genom eines Organismus oft wiederholt werden. Informative Mikrosatelliten weisen einen Längenpolymorphismus zwischen den beiden

Parentalstämmen DBA/1J und FVB/N auf. Mit Hilfe der Datenbank von „The Jackson Laboratory-MGI“ ([www.informatics.jax.org](http://www.informatics.jax.org)) wurden 132 informative Mikrosatelliten-Marker und die entsprechenden Primer für die genomweite Kopplungsanalyse der F2-Generation DBA/1J x FVB/N Mäuse gefunden. Die Reihenfolge und Position der Marker basiert ebenso auf den Angaben von „The Jackson Laboratory“. Die für diese Arbeit verwendeten 132 informativen Mikrosatellitenmarker decken dabei 94% des Genoms ab. Die durchschnittliche Inter-Marker Distanz beträgt 11,22 cM.

Um den Längenpolymorphismus darzustellen, wurde eine PCR mit zwei Oligonukleotidprimern durchgeführt, welche die polymorphe DNA-Sequenz flankieren. Darüber hinaus wurde der PCR noch ein Dritter Primer (M13) zugesetzt, der an eine zusätzlich an den Vorwärts-Primer angehängte Sequenz bindet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff (IRD 700 oder IRD 2, LICOR Biosciences, Bad Homburg) markiert ist, um die amplifizierten DNA-Fragmente in dem Kapillarelektrophorese-Sequencer (CEQ 8800, Beckman Coulter) sichtbar zu machen.

Für die vorliegende Arbeit wurde eine Multiplex-PCR durchgeführt. Dabei werden mehrere Primerpaarungen (Vorwärts- und Rückwärtsprimer) gleichzeitig im selben PCR-Ansatz verwendet. Dies setzt jedoch voraus, dass diese in etwa die gleichen Reaktionsbedingungen benötigen. Darüber hinaus sind nur solche Primer sinnvoll „plexbar“, die für den Einsatz am Sequencer unterschiedliche Farbmarkierungen aufweisen bzw. sich in den Längen der produzierten Fragmente so unterscheiden, dass diese problemlos in der Analyse zu identifizieren sind.

Zur Kontrolle der Kontaminationsfreiheit mit Fremd-DNA wurde eine Negativkontrolle mitgeführt. Dabei wird in einen standardgerechten PCR-Ansatz Wasser anstelle der DNA-Probe verwendet. In Falle der Kontaminationsfreiheit sollten sich in der späteren Analyse der PCR-Produkte in diesen Proben keine Fragmente finden.

Für den Ansatz im Sequencer waren zu jeder Probe folgende Substanzen in die vorgesehenen Probenfelder der speziellen Sequenzierplatten (Thermo-Fast 96, non skirted (Abgene, Epsom, UK)) zu pipettieren:

Hot Start Taq Polymerase	(0,25 U QIAGEN, Hilden)
Vorwärts-Primer	(0,1 $\mu$ M, Sigma-Ark, Darmstadt)
Rückwärts-Primer	(0,1 $\mu$ M, Sigma-Ark, Darmstadt)
dNTP	(0,2 mM, peqLab, Erlangen)

M13-	(0,2 $\mu$ M)
MgCl <sub>2</sub>	(2,5 mM)
Template-DNA	(20 ng)

Folgende Schritte folgten:

- PCR-Produkt mit 100  $\mu$ l A.d auffüllen und dann jeweils 3  $\mu$ l in die vorgesehenen Probenfelder pipettieren
- den Ansatz mit 30  $\mu$ l destilliertem Wasser auffüllen
- 3  $\mu$ l eines speziellen „Size Standards“, der ebenfalls fluoreszenzmarkiert ist, zugeben. Dieser ist für die automatische Auswertbarkeit durch die Software sehr wichtig
- 1 Tropfen Mineral Oil als Verdunstungsschutz auf jedes Probenfeld geben. In einer zweiten Platte wurden die mit den Proben korrespondierenden Feldern zu 2/3 mit dem speziellen Sequenzierpuffer, welcher ebenfalls von der Firma Beckman Coulter hergestellt wird, gefüllt. Die PCR-Platten wurden anschließend mit „Adhesive PCR film“ (Abgene, Epsom UK) verschlossen.

Die Amplifizierung der PCR erfolgte unter den folgenden PCR Touch down-Bedingungen: Initial erfolgte eine Denaturierung bei 95°C für 15min, danach folgten 2 Zyklen bestehend aus jeweils 30sec bei 94°C, 1min bei 57°C (-1°C je Zyklus) und 1min bei 72°C, anschließend erfolgten 37 Zyklen aus 30sec bei 94°C, 1min bei 55°C (-1°C je Zyklus) und 1min bei 72°C. Abschließend erfolgte eine finale Elongation von 7min bei 72°C, um ganz sicher zu gehen, dass die Polymerase ihre Arbeit beendet. Anschließend wurden die Proben auf 4°C herunter gekühlt. Die Zeit bei diesem Schritt wurde auf unendlich gestellt. So waren die Proben geschützt und konnten jeder Zeit entnommen werden. Die anschließende Lagerung erfolgte ebenfalls bei 4°C.

### 2.2.3 Fragmentlängenanalyse am Sequencer

Die Fragmentlängeanalyse erfolgte an einem 8 Kanal Capillar Elektrophorese Sequenzautomaten vom Typ CEQ 8000 Genetic Analysis System der Firma Beckman Coulter. Dieses Gerät arbeitet nach dem Prinzip der Glaskapillarelektrophorese mit Hilfe des elektrophoretischen und elektroosmotischen Flusses. Der elektrophoretische Fluss basiert auf der elektrischen Anziehungskraft, welche die negativ geladenen DNA-Fragmente der Proben zum Fluß durch das Kapillarsystem des Automaten veranlasst. Dies geschieht durch eine angelegte, positive elektrische Spannung. Der elektroosmotische Fluss wirkt auf die Fragmente

durch das in der Kapillare angelegte Potential, welches den gesamten Elektrolytfluss bedingt. Die Wanderungsgeschwindigkeit bis zum Detektierlaser des Gerätes ist multifaktoriell beeinflusst, z.B. durch die Kapillarlänge, deren Durchmesser, der Länge und Ladung der Fragmente, dem pH-Wert des Milieus sowie der angelegten Spannung. Durch Koordination der Faktoren lassen sich anhand der gemessenen Laufzeit den DNA-Fragmenten, welche anhand der dye-Markierung der Vorwärts-Primer vom Laser erkannt werden konnten, die spezifischen Fragmentlängen zuordnen. Somit konnte anhand der Messspitzen entschieden werden, ob zwei verschieden lange Fragmentlängen, also zwei Allele (heterozygot) in der Probe amplifiziert wurden oder zwei gleich lange homozygote Allele in der Probe vorhanden waren.

#### **2.2.4 RNA Präparation**

Zur Gewinnung der RNA aus Mauspfoten und Lymphknoten wurde das „RNeasy Mini Kit“ von Qiagen (Hilden) nach Herstellerangaben verwendet. Für die Zentrifugationsschritte wurde die Zentrifuge Mikro 20 (Hettich, Tuttlingen) genutzt.

Die Pfoten und Lymphknoten wurden nach makroskopischer Untersuchung (siehe 2.3) entnommen und zunächst bis zur Weiterbearbeitung in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Gewinnung von Gesamt-RNA wurden sie dann in RLT-Extraktionspuffer (+1%  $\beta$ -Mercaptoethanol; Sigma, Deisenhofen) gemörsert. Die präparierten Lymphknoten wurden mit 600  $\mu$ l RLT-Extraktionspuffer (+1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol; Sigma, Deisenhofen) in 2 ml-Röhrchen mit Keramikugeln (Lysing Matrix D von Q-BIO gene, Heidelberg) in einer FastPrep FP 120 Shredder-Zentrifuge (BIO 101 SAVANT Instruments, Holbrook, New York, USA) für 45 sec bei einer Einstellung von 6.0 m/sec zerkleinert und anschließend auf Eis gekühlt.

Die lysierten Proben wurden anschließend auf „QIAshredder“-Säulen gegeben und 4 min bei 13,000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde mit dem gleichen Volumen an 70 % Ethanol gemischt und auf „RNeasy Mini Spin“-Säulen gegeben. Nach 1-minütiger Zentrifugation bei 10,000 rpm wurde einmal mit 500  $\mu$ l RW1-Puffer gewaschen und anschließend während einer 20- bis 30-minütigen Behandlung mit 10  $\mu$ l DNase (Deoxyribonuclease) I und 70  $\mu$ l RDD-Puffer noch vorhandene DNA verdaut. Es folgten erneut drei Waschschrte, einmal mit 500  $\mu$ l RWI-Puffer und anschließend zweimal mit je 500  $\mu$ l RPE-Puffer. Nachdem die Säule schließlich bei 13000 rpm für 5 min trocken zentrifugiert wurde, erfolgte die zweimalige Eluierung der gebundenen RNA mit jeweils 40-50  $\mu$ l RNase-freiem Wasser bei 11,500 rpm

über 5 min. Die Bestimmung der Konzentration der RNA erfolgte spektrophotometrisch (Wilmington, USA) bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Quarzküvette. Die Reinheit wurde durch den Quotienten  $OD_{260nm}/OD_{280nm}$  bestimmt. Der Quotient lag zwischen 1,8 und 2,0. Falls der Quotient  $< 1,8$  und ein Quotient  $> 2,0$  ist, liegt meist eine Verunreinigung durch Salze oder Nukleotide vor. Die Qualität der isolierten RNA wurde mittels Elektrophorese in einem 1,6% TBE-Agarose-Gel überprüft. An den Banden der ribosomalen RNAs ist die Qualität der RNA abzuschätzen. Dabei ist im Idealfall die Intensität der 28S rRNA doppelt so hoch wie die der 18S sRNA.

### 2.2.5. Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Die Reverse Transkription der RNA in komplementäre DNA (cDNA) erfolgte mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase. Die cDNA diente als Template für die Real-Time PCR (siehe 2.2.6). Dabei wurde folgender Ansatz hergestellt:

<b>Ansatz:</b>	RNA-Probe	1 µl
	RNase freies H <sub>2</sub> O (Qiagen, Hilden)	7,5 µl
	5 x First Strand Buffer (Invitrogen, Karlsruhe)	5 µl
	dNTP (2,5 mM; peqLab, Erlangen)	8 µl
	DTT (0,1 M; Promega, Mannheim)	1 µl
	RNase Inhibitor (40 U/µl; Promega, Mannheim)	0,5 µl
	SUPERSCRIPT II (200 U/µl, Invitrogen, Karlsruhe)	1,5 µl
	Hexamäre Primer (50 µM; Sigma-Ark, Darmstadt)	1,5 µl

Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte während einer anschließenden zweistündigen Inkubation bei 42°C. Die Reaktion wurde danach auf Eis abgekühlt und die cDNA wurde bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert.

### 2.2.6. TaqMan Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (Real-Time PCR) kann die Kopienzahl eines Templates (cDNA oder RNA) bestimmt werden. Dazu wird eine Oligonukleotid-Sonde benutzt, die zwischen Vorwärts- und Rückwärts-Primer an das Ziel-Template bindet. Am 5'-Ende ist die Sonde mit dem Reporter (Fluoreszein) markiert, am 3'-Ende trägt sie einen Quencher (Rhodamin), welcher das Aussenden eines Fluoreszenzsignals verhindert, solange Reporter und Quencher dicht genug liegen. Während der Amplifikation in der PCR-Reaktion



wird die Sonde durch die Exonucleaseaktivität der Taq Polymerase zerstört, so dass Quencher und Reporter räumlich voneinander getrennt werden. Dadurch wird das Fluoreszenzsignal sichtbar. Die gemessene Intensität korreliert mit der Anzahl amplifizierter DNA. Um die unterschiedlichen Proben untereinander vergleichen zu können, erfolgte die Normalisierung durch die Amplifikation eines Kontrollgens, des sogenannten Housekeeping-Gens.

In unserer Untersuchung war dies GAPDH (Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase), welches am 5'-Ende der Sonde mit dem Fluoreszenzfarbstoff VIC statt FAMs markiert war.

Die Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit wurden mit dem Real-Time PCR-Gerät ABI PRISM TM 7700 sequence detection system (Perkin-Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany) durchgeführt. Die eingesetzten TaqMan-Sonden für die Ziel-Gene enthielten am 5'-Ende den Fluoreszenzfarbstoff FAM [6-Carboxyfluorescein] und am 3'-Ende den Quencher TAMRA [6-Carboxyltetramethylrhodamin].

#### **Master Mix mit Pre-Developed-Assays:**

2 x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Weiterstadt)	10 µl
pfp - Vorwärts-Primer (10 µM; Sigma-Ark, Darmstadt)	0,25 µl
pfp - Rückwärts-Primer (10 µM; Sigma-Ark, Darmstadt)	0,25 µl
pfp - Sonde (20 µM; Sigma-Ark, Darmstadt)	0,25 µl
H <sub>2</sub> O (RNase-frei)	9,25 µl
cDNA (100 ng einer 20 ng/µl Lösung)	5 µl

#### **Master Mix für GAPDH:**

2 x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Weiterstadt)	10 µl
GAPDH - Vorwärts-Primer (10 µM)	0,25 µl
GAPDH - Rückwärts-Primer (10 µM)	0,25 µl
GAPDH - Sonde (20 µM)	0,25 µl
H <sub>2</sub> O (RNase-frei)	9,25 µl
cDNA (100 ng einer 20 ng/µl Lösung)	5 µl

#### **Programm:**

95°C	10 min	
95°C	15 sec	} 45 x
60°C	1 min	

### **Auswertung:**

Für die Quantifizierung der Genexpression wurde der  $C_T$ -Wert (Threshold Cycle) verwendet. Der  $C_T$ -Wert ist die Zahl des ersten PCR-Zyklus, bei dem ein Fluoreszenzsignal ausgesendet wird, welches größer als der Schwellenwert ist. Der  $C_T$ -Wert ist umso kleiner, je größer die Ausgangsmenge der Zielsequenz war. In der exponentiellen Phase entspricht die Halbierung der cDNA-Ausgangsmenge einem  $C_T$ -Wert-Anstieg um einen Zyklus. Die relative Expression des Zielgens wurde nach folgender Gleichung errechnet (nach „User Bulletin #2“ von Applied Biosystems):

$$\text{Relative Genexpression} = 2^{Ct(\text{GAPDH}) - Ct(\text{Target})}$$

## **2.3 Intravitale fluoreszenzmikroskopische Untersuchung**

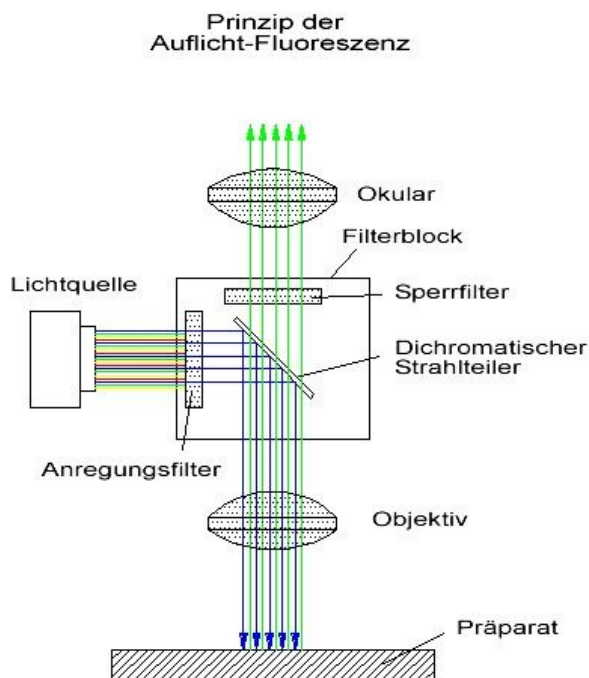
Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie (IVM) ist eine etablierte Methode zur Analyse der Organmikrozirkulation und gut geeignet, um direkt die Mikrozirkulation im „Hoffa Fettkörpers“ zu visualisieren. Sie ermöglicht die quantitative Beurteilung der mikrohämodynamischen Parameter und der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion d.h. Leukozyten-Rolling sowie Adhäsion und Migration in vivo (Granger et al, 1994; Johnston et al, 1995).

### **2.3.1 Prinzip der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie**

Fluoreszenz ist Licht, das durch Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge erzeugt wird (Häder DP et al, 1993), was bei der Epiilluminationsmikroskopie (Abb. 2-2) genutzt wird. Zur Beobachtung der Fluoreszenzemission sind Sperrfilter in den Strahlengang eingebracht, die das Licht des Anregungsspektrums absorbieren oder reflektieren. Im Okular erscheint deshalb keine Anregungsstrahlung, während das Fluoreszenzlicht die Sperrfilter passiert.

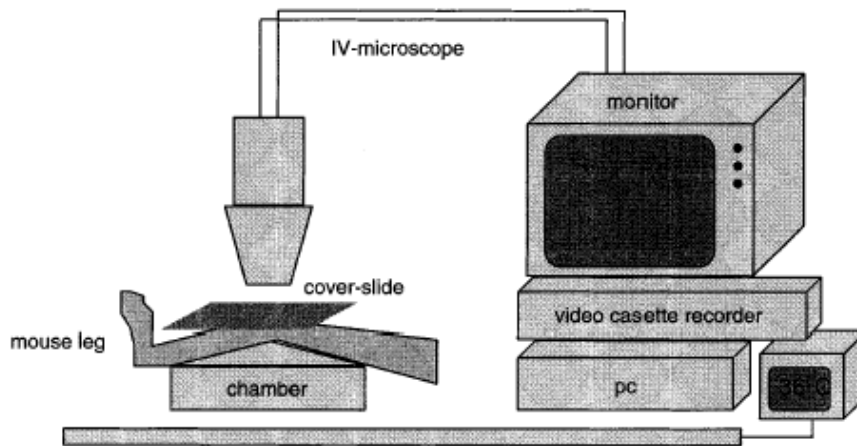
Fluoreszenzfarbstoffe wurden als Indikatoren eingesetzt, weil Blutplasma, Endothelzellen, Blutzellen und insbesondere Leukozyten keine ausreichende Eigenfluoreszenz besitzen. Hochmolekulares, an den Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) gekoppeltes Dextran (durchschnittliches MG: 150.000 u; Sigma, Deisenhofen), garantiert die Kontrastverstärkung des Plasmas. Rhodamin 6G (Merck, Darmstadt), ein positiv geladener, lipophiler Fluoreszenzfarbstoff, mit einem Molekulargewicht von 479 DA, färbt

Mitochondrien sowie Kernstrukturen lebender Zellen (Baatz et al, 1995; Villringer et al, 1991) und eignet sich zur Visualisierung von Leukozyten in Blutgefäßen.



**Abb. 2-2:** Schematische Darstellung des grundsätzlichen Aufbaus einer Auflichtfluoreszenzeinrichtung (Quelle: <http://www.juelich-bonn.com/site/mikroskop/texte/fluoreszenz/>)

Das intravitale Mikroskop beinhaltet ein Zeiss Axiotech Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit einer 100 W Quecksilberlampe und Filter für blaues (Exzitation: Wellenlänge= 465-495 Nanometer, Emission: Wellenlänge >505 Nanometer) und grünes Anregungslicht (Exzitation: Wellenlänge=510-560 Nanometer, Emission: Wellenlänge >575 Nanometer). Unter Wasserimmersion wurde ein Objektiv ( $\times 40$  W/numerische Apertur 0.8; Karl Zeiss) verwendet, um die Vergrößerung von  $630\times$  zu erzielen. Alle beobachteten Mikroskopbilder wurden durch ein Video-System (S-VHS Panasonic AG 7350-E, Matsushita, Tokio, Japan) für die offline Evaluation durch eine CCD-Kamera (FK 6990A-IQ, Pieper, Berlin, Deutschland) aufgenommen und auf einem Bildschirm mit Zwischenschaltung eines Zeitgenerators (VTG-33, For-A, Japan) dargestellt (siehe Abb. 2-3). Sämtliche Analysen mikrozirkulatorischer Parameter wurden nach Beendigung der intravitale Fluoreszenzmikroskopie durch Wiedergabe des Videobandes mit dem computerassistierten Bildverarbeitungssystem CapImage (Version, 7.4, Dr. Zeintl Software, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt.



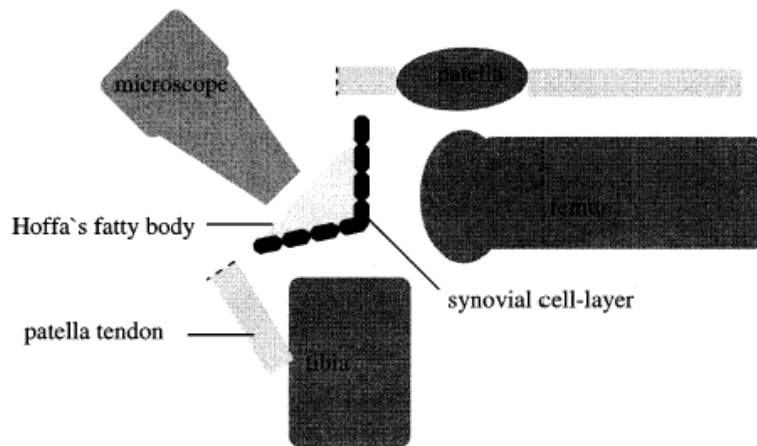
**Abb. 2-3:** Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus. Die Mäuse werden auf eine Heizplatte gesetzt. Das rechte Bein wird durch Pflaster immobilisiert. Die CCD-Kamera ist mit Monitor, Videorekorder und Computer verbunden (Quelle: Veihelmann et al, 1998).

### 2.3.2 Anästhesie und chirurgische Präparation der Versuchstiere

Die zu untersuchenden Mäuse wurden zuerst durch i.p. Injektion von Ketamin (90 mg/kg, Ketamin® Betapharm GmbH & Co.KG, Vechta, Deutschland) und Xylazin (6 mg/ kg, Rompus®, Bayer Vital GmbH, Bayer Health Care, Deutschland) narkotisiert. Nach 30 min wurde nach Bedarf Ketamin (35-40 mg/kg) nachgespritzt. Danach wurden die Tiere gewogen und auf eine Heizplatte gesetzt, um ihre Körpertemperatur von 37°C beizubehalten.

Für die intravitale Fluoreszenzmikroskopie der synovialen Mikrozirkulation benutzten wir das Kniegelenk-Modell (Veihelmann et al, 1998).

Nach der Enthaarung wurde die Haut des rechten Knies eingeschnitten, welche distal zur Patellarsehne lag. Nach der Resektion des darüber liegenden weichen Gewebes wurde die Patellarsehne transversal geschnitten und das proximale und distale Teil sorgfältig mobilisiert (siehe Abb. 2-4). Danach wurde der Fettkörper mit einem Objektträger abgedeckt. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden nachfolgend in die linke jugulare Vene injiziert. Nach einer 15 minütigen Stabilisationsperiode wurde die intravitale fluoreszenzmikroskopische Untersuchung durchgeführt.



**Abb. 2-4:** Schematische Darstellung des chirurgischen Ansatzes. Nach Resektion der Haut wird die Patellar-Sehne geschnitten, um den „Hoffa Fettkörper“ darzustellen, in dessen inneren Seite sich Synovialzellen befinden (Quelle: Veihelmann et al, 1998)

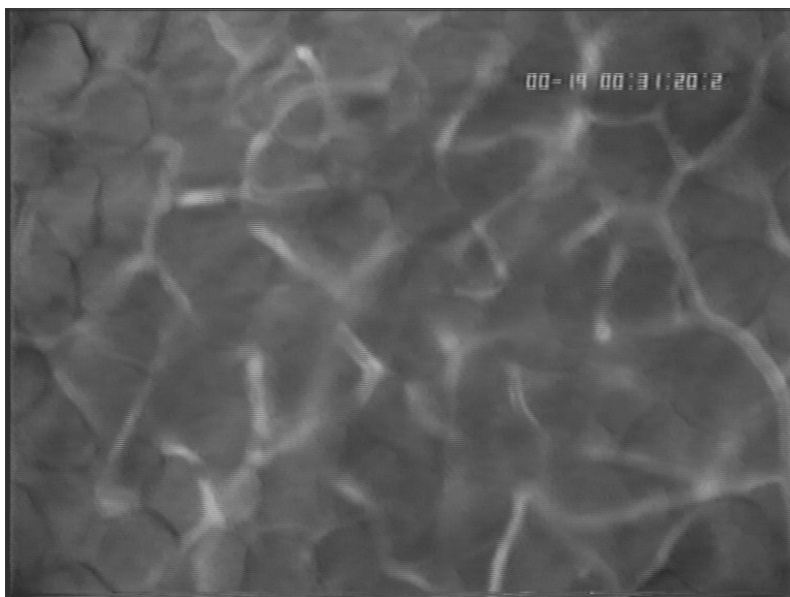
### 2.3.3 Mikrozirkulatorische Parameter

Nach intravenöser Applikation von FITC-Dextran (15 mg/kg Körpergewicht; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und Rhodamin 6G (0.15 mg/kg Körpergewicht; Sigma) wurde die intravitale Mikroskopie durchgeführt. Dabei wurden folgende mikrohämodynamische Parameter gemessen:

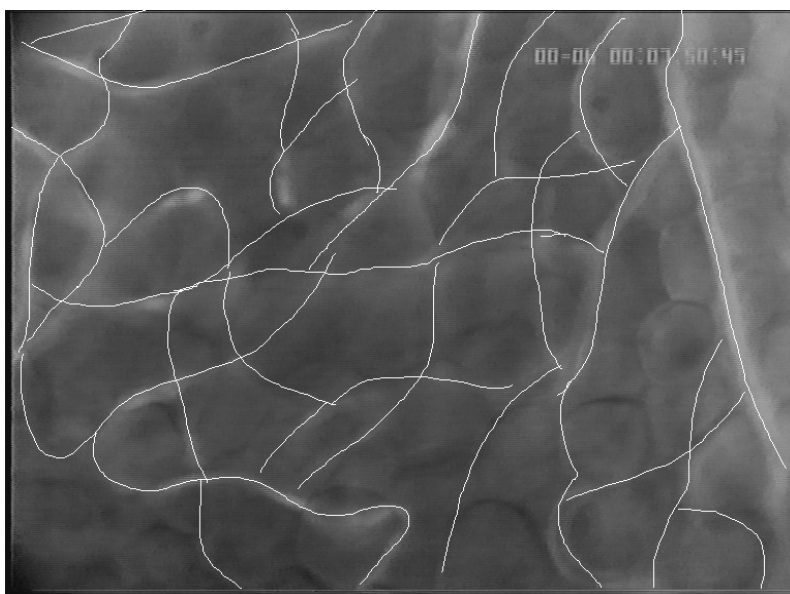
- |   |   |   |
|---|---|---|
| --- Kapillare<br>(siehe 2.3.3.1)            | { | --- Funktionelle kapillare Dichte<br><br>--- Durchmesser  |
| --- postkapillare Venole<br>(siehe 2.3.3.2) | { | --- Durchmesser<br>--- Blutzellfließgeschwindigkeit (V-RBC)<br>--- Schnelle Leukozyten (frei-fließende Zellen)<br>--- Leukozyten-Rolling<br>--- Leukozyten-Adhärenz |

#### 2.3.3.1 Mikrozirkulatorische Parameter in der Kapillare

Die funktionelle kapillare Dichte (Functional Capillary Density (FCD)) ist definiert als die Gesamtlänge der durchbluteten Kapillaren pro Gesichtsfeld (siehe Abb. 2-5a,b) und wird in Zentimetern/Quadratzentimetern ( $\text{cm}/\text{cm}^2$ ) angegeben. Pro Maus wurden 4-5 Gesichtsfelder aufgenommen.

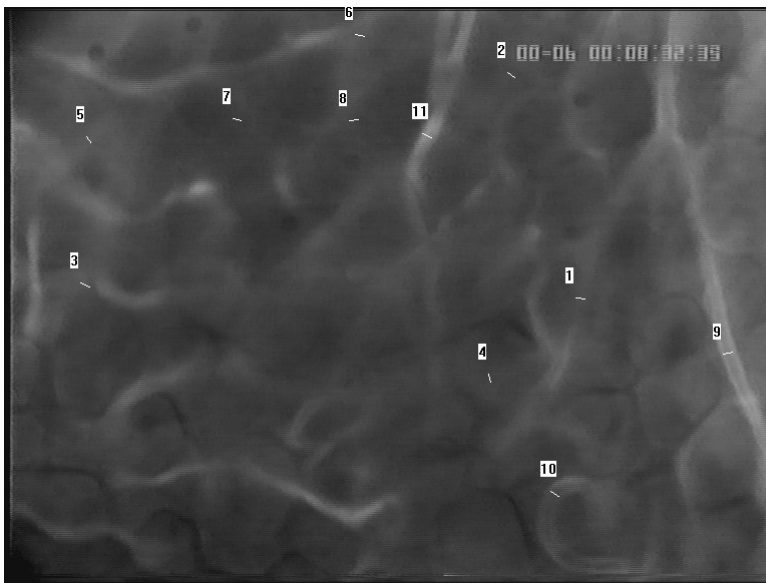


**Abb. 2-5a:** Intravitalmikroskopische Darstellung der Kapillaren im synovialen Fettkörper des Mausekniees nach Plasmafärbung mit hochmolekularem FITC-Dextran (Vergrößerung x 453).



**Abb. 2-5b:** Funktionelle Kapillardichte, gemessen als die Gesamtlänge der perfundierten Kapillaren.

Die Gefäßdurchmesser der beobachteten Kapillaren wurden computerassistent quantifiziert. Am „stehenden“ Videobild konnte der Durchmesser in  $\mu\text{m}$  durch Verbindung zweier Punkte am Gefäßrand, die senkrecht zum Gefäßverlauf liegen (siehe Abb. 2-5c), bestimmt werden. Die Gefäßgrenzen waren bei dieser Methode eindeutig messbar, da der Plasmamarker FITC-Dextran in Epi-Illumination auch den Erythrozyten-freien Plasmasaum zur Darstellung bringt.

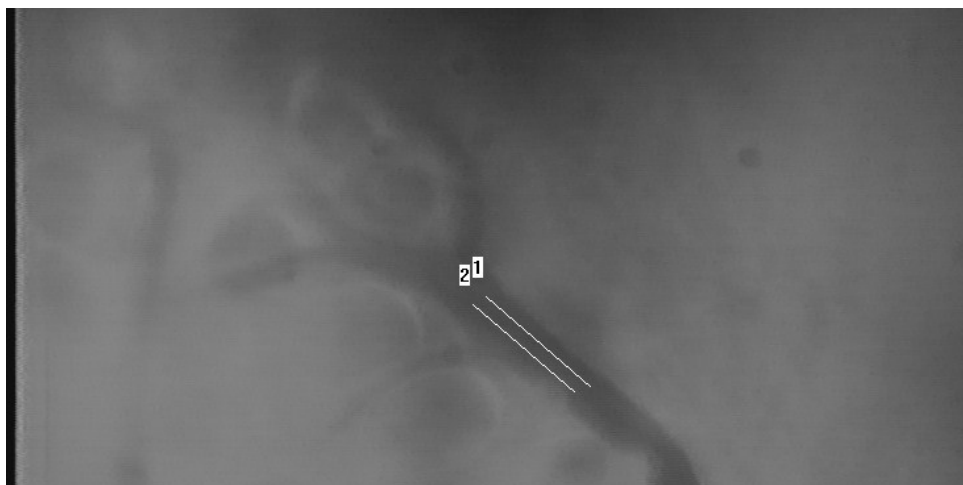


**Abb. 2-5c:** Analyse der Gefäßdurchmesser. Am „stehenden“ Videobild konnte der Durchmesser in  $\mu\text{m}$  durch Verbindung zweier Punkte am Gefäßrand, die senkrecht zum Gefäßverlauf liegen, bestimmt werden.

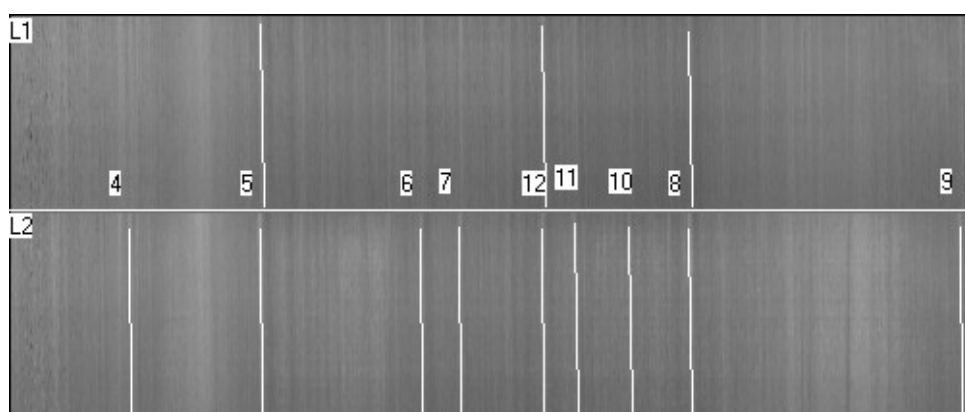
### 2.3.3.2 Mikrozirkulatorische Parameter in der postkapillaren Venole

Die Messung der Blutzellgeschwindigkeit wurde in Venolen durchgeführt, in denen zuvor bereits die Bestimmung des Gefäßdurchmessers (wie bei Kapillaren, siehe 2.3.3.1) erfolgte. Zur Bestimmung der Blutzellgeschwindigkeit wurde die computerassistierte Line-Shift-Diagramm-Methode angewendet (Klyscz et al, 1997). Entlang der Flussrichtung des zu messenden Gefäßes wird hierzu eine zentral im Lumen gelegene Messlinie (siehe Abb. 2-6a) definiert und anschließend das Videoband für ca. 10 sec in Echtzeit abgespielt. Währenddessen wird fortlaufend für jedes Halbbild entlang der Messlinie das Grauwertprofil erstellt und in einem Bildspeicher aufgezeichnet. Aus den aneinandergereihten Grauwertprofilen erzeugt das Programm ein Line-Shift-Diagramm (siehe Abb. 2-6b), in dem helle bzw. dunkle schräge Linien zu erkennen sind, wenn sich während der Messung Plasmalücken bzw. Erythrozyten entlang der Messlinie bewegt haben. Aus der Steigung dieser Linien kann anschließend die Blutzellgeschwindigkeit in  $\mu\text{m/s}$  errechnet werden (Klyscz et al, 1997). Um die Scherkräfte zu vergleichen, die auf die rollenden und adhärenen Leukozyten in den Venolen wirkten, wurde die Scherrate ( $\gamma$ ) ermittelt. Sie berechnet sich aus dem Quotienten aus Blutzellgeschwindigkeit ( $v$ ) und Gefäßdurchmesser ( $d$ ) und basiert auf der Newton'schen Definition:

$$\gamma = 8 * v/d.$$



**Abb. 2-6a:** Intravitalmikroskopische Aufnahme einer postkapillaren Venole im Hoffa'schen Fettkörper am Mausknie mit 2 parallel definierten Messlinien zur Erfassung der Blutzellgeschwindigkeit.



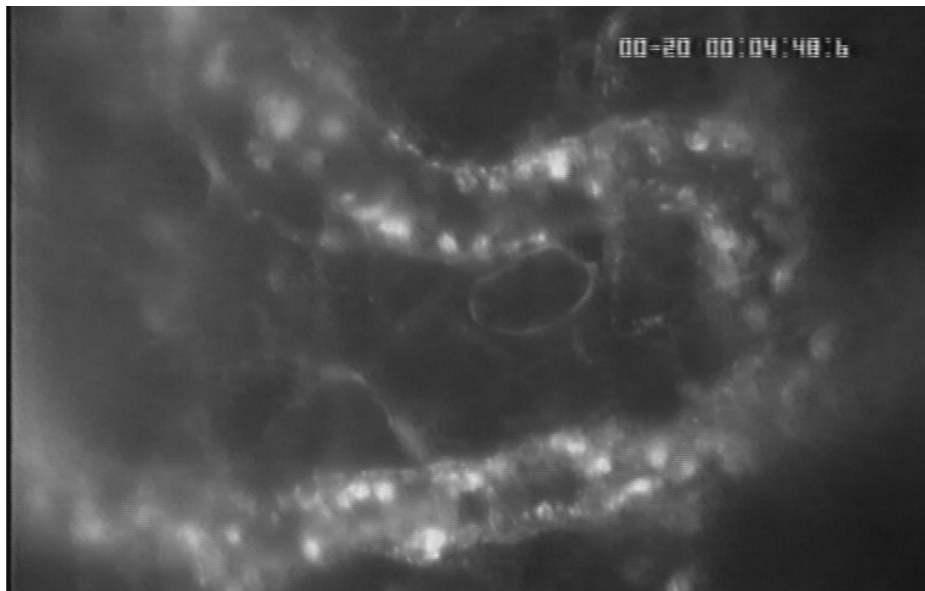
**Abb. 2-6b:** Nach Abspielen des Videobandes für etwa 12 s entsteht das Line-Shift-Diagramm für jede der einzelnen Messlinien, anhand derer die Geschwindigkeit des Blutflusses ( $\mu\text{m/s}$ ) aus der Steigung der aneinandergereihten Grauwertprofile errechnet werden kann.

Die Leukozyten, die eine Interaktion mit dem Endothelium zeigen, wurden entweder als rollende oder adhärente Zellen definiert. Rollende Leukozyten sind Zellen, die bei Passage der Gefäße transient die endotheliale Oberfläche berührten und deren Fließgeschwindigkeit sichtbar langsamer als die anderer Zellen ist.

Die Fraktion rollender Leukozyten wird als Prozentsatz der Gesamtleukozyten durch ein definiertes Gefäßsegment innerhalb einer Beobachtungsperiode von 30 s ausgedrückt (errechnet als rollende Zellen/rollende Zellen und frei-fließende Zellen, siehe Abb. 2-7a).



Adhärente Leukozyten, die sogenannten „Sticker“, werden als jene Leukozyten definiert, welche an der gleichen Position auf dem Endothel für die gesamte Beobachtungsperiode von 30 s festhaften (ausgedrückt als Zellen/mm<sup>2</sup> der endothelialen Oberfläche, siehe Abb. 2-7b). Die endotheliale Oberfläche wurde vom Durchmesser und von der Länge (50-100 Millimeter) des Gefäßsegments unter Annahme einer zylindrischen Geometrie errechnet.



**Abb. 2-7a,b :** Intravitalmikroskopische Aufnahme einer postkapillaren Venole im Hoffa'schen Fettkörper am Mausknies unter Grünlicht-Epiillumination mit Darstellung der Leukozyten.

## **2.4 Strategien zur Identifikation von Suszeptibilitätsgenen in der CIA**

Wie oben geschrieben, hat die CIA multifaktorielle Ursachen. Dabei handelt es sich um eine Kombination suszeptibler Gen-Allele auf multiplen Loci, diverser Umweltfaktoren und zufälliger Ereignisse. Die Identifikation von Suszeptibilitätsgenen ist aufgrund dieser Komplexität sehr schwierig. Folgende Verfahren wurden in dieser Arbeit wofür verwendet.

### **2.4.1 Quantitative Trait Loci**

Als Quantitative Trait Locus (abgekürzt QTL, Mehrzahl Quantitative Trait Loci) wird in der Genetik ein Abschnitt eines Chromosoms bezeichnet, für den in entsprechenden Studien ein Einfluss auf die Ausprägung eines quantitativen phänotypischen Merkmals des betreffenden Organismus nachgewiesen wurde.

Die phänotypischen Merkmale in unserer Studie sind in Kap. 2.3.3 beschrieben. Zur Analyse von QTLs wird in Studien die Ausprägung eines bestimmten Merkmals in Relation zu Variationen von genetischen Markern untersucht. Diese Marker sind Abschnitte in der DNA-Sequenz, die in verschiedenen Individuen in unterschiedlichen Formen, sogenannten Allelen, auftreten. Für QTL-Analysen sind vor allem Genmarker mit einem hohen Polymorphismusgrad, also einer hohen Zahl an verschiedenen Allelen, von Interesse. Alle diese Polymorphismen sind sogenannte anonyme Marker, da ihnen keine funktionelle Bedeutung zugeordnet ist und sie im Regelfall keinem spezifischen Gen entsprechen. Für sogenannte genomweite QTL-Studien wird eine größere Zahl an Markern ausgewählt, die gleichmäßig über das gesamte Genom der zu untersuchenden Lebewesen verteilt sind. Die Zahl der Marker in Relation zur gesamten Genomgröße wird als Markerdichte bezeichnet, eine höhere Markerdichte erlaubt dabei eine bessere Eingrenzung der QTL auf einen kleineren chromosomalen Bereich.

### **2.4.2 Genomweite Kopplungsanalyse**

Genetische Kopplung wurde erstmals von Morgan et al. Anfang des 20. Jahrhunderts beschrieben. Sie stellt eine weitverbreitete Methode zur Detektion von Kopplungen zwischen genetischen Markern und Loci dar, die zur variablen Ausprägung eines phänotypischen Merkmals führen. Kopplung beschreibt die Vererbung eines genetischen Markers mit dem Krankheitsphänotyp innerhalb einer Familie. Es wird davon ausgegangen, dass eine bestimmte Markervariante (Allel) zusammen mit dem prädisponierenden Gen vererbt wird, wenn beide in geringem Abstand zueinander liegen.

Bestimmte genetische Marker werden besonders häufig genutzt. So werden die Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP)-Marker (Lander und Botstein, 1986), Einzelnukleotidpolymorphismen (single nucleotide polymorphisms - SNPs) (Kruglyak, 1997) und vor allem die Mikrosatellitenmarker (short tandem repeats – STRs) (Weber und May, 1989) am häufigsten verwendet. Mikrosatelliten oder „short tandem repeats“ sind DNA-Sequenzen von repetitiven einfachen Basenmotiven mit einer Länge von meist weniger als 60 Basenpaaren (bp) (Weber und Wong, 1993). 50,000-100,000 solcher Mikrosatelliten sind über das Genom der Säugetiere in mehr oder weniger regelmäßigen Abständen verteilt. Die zugrunde liegenden Sequenzmotive sind meist 2-4 bp groß. Überwiegend gibt es repetitive Dinukleoidsequenzen von ungefähr 50-150 Kopien. Eine genetische Karte kann durch die Analyse eines genomweiten Markermusters konstruiert werden, die auf den Rekombinationsereignissen der Meiose der F1-Eltern beruht. Um ein möglichst genaues Ergebnis zur Einschätzung des untersuchten Phänotyps zu bekommen, wurden bei dieser Arbeit 155 Mäuse detailliert genotypisiert und phänotypisiert.

Mit Hilfe des Computerprogramms (Map Manager QTX) wird anschließend die statistische Assoziation zwischen jedem Markerlocus und dem zu untersuchenden Phänotyp bestimmt. Das am häufigsten verwendete Prinzip zur Berechnung von QTLs ist die Intervallkartierung, bei der die Existenz eines QTLs zwischen zwei kartierten Markerloci getestet und durch einen Wahrscheinlichkeitswert als Logarithmus von odds Ratio (LOD) ausgedrückt wird (Lander und Botstein, 1989). Als Maß für die Wahrscheinlichkeit einer Kopplung dient der Lod Score, der je nach seiner Höhe nach den Kriterien von Lander und Kruglyak als „suggestiver“ oder „signifikanter“ Kopplungsbefund bewertet wird (Lander und Kruglyak, 1995). Von einem suggestiven Kopplungsbefund spricht man bei einem Lod Score von 1,9 und von einem signifikanten bei 3,3.

#### **likelihood of QTL at position**

#### **likelihood of no QTL at position**

Durch Permutationsanalysen, bei denen experimentspezifische Signifikanzschwellenwerte für jeden analysierten Phänotyp festgelegt werden, wird die relative Signifikanz der erhaltenen Kopplungen zu QTLs überprüft und abgesichert (Churchill und Doerge, 1994).

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Ergebnisse der mikrozirkulatorischen Messung mit IVM

Es wurden insgesamt 155 (DBA/1J×FVB/N) F2 Mäuse mit Rinderkollagen II (siehe Kap. 2.1.2) immunisiert. 3 Wochen nach der Immunisierung wurden die Mäuse mittels intravitaler Multifluoreszenzmikroskopie untersucht, um die mikrovaskuläre Perfusion mittels der Bestimmung der funktionellen kapillaren Dichte, kapillarer Durchmesser und der Blutfließgeschwindigkeit (V-RBC) zu messen, und um die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion durch Messung der Fraktion rollender Leukozyten und der Zahl adhärenter Leukozyten im synovialen Fettkörper zu untersuchen.

Nach intravenöser Gabe des Plasmamarkers FITC-Dextran (5%), welcher sich aufgrund seines hohen Molekulargewichtes (MG 150.000D) durch eine nur geringe Extravasation auszeichnet, konnte mittels intravitaler Multifluoreszenzmikroskopie die Mikrozirkulation des synovialen Fettkörpers kontrastreich dargestellt werden. Die Leukozyten in den postkapillaren Venolen wurden mit Hilfe von Rhodamin 6G unter grünem Licht visualisiert.

##### 3.1.1 Mikrovaskuläre Perfusion und Kapillardurchmesser

Unter der funktionellen kapillaren Dichte (FCD) versteht man als die Gesamtlänge der perfundierten Kapillaren pro Gesichtsfeld, welche in  $\text{cm}/\text{cm}^2$  angegeben wird. Pro Maus wurden 4-5 Gesichtsfelder ausgemessen. Die Mittelwerte wurden für die endgültige Auswertung verwendet.

Die Werte der FCD von allen 155 Kollagen-induzierten Mäusen lagen in einem Bereich von 427 bis 801  $\text{cm}/\text{cm}^2$  (Mittelwert  $596 \pm 87 \text{ cm}/\text{cm}^2$ ).

Die Gefäßdurchmesser der untersuchten Kapillaren wurden computerassistent quantifiziert. Hier zeigte sich der Mittelwert von  $4,1 \pm 0,3 \mu\text{m}$ .

##### 3.1.2 Blutfließgeschwindigkeit der Erythrozyten (V-RBC)

In den postkapillaren Venolen wurden die V-RBC bestimmt. Die Messung der V-RBC (Abd. 3-2 a,b) wurde in Venolen durchgeführt, in denen nachher auch die Bestimmung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion (siehe 2.3.3.2) erfolgte. Der Mittelwert betrug  $0,7 \pm 0,3 \text{ mm/s}$ .

### **3.1.3 Bestimmung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion**

In den postkapillären Venolen wurde die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion analysiert. Die Fraktion rollender Leukozyten lag zwischen 5 und 85% (Mittelwert  $\pm$  SD:  $35 \pm 17\%$ ). Die Zahl adhärenter Leukozyten lag zwischen 40 bis 2621 Zellen/mm<sup>2</sup> (Mittelwert  $\pm$  SD:  $839 \pm 549$  zellen/mm<sup>2</sup>).

## **3.2 Ergebnisse der genomweiten Kopplungsanalyse**

### **3.2.1 Genomweite Kopplungsanalyse in der F2-Generation**

Zur Identifizierung derjenigen QTLs, welche die krankheitsauslösende Leukozyten-Endothelzell-Interaktion bei der CIA vermitteln, wurde eine Kopplungsanalyse durchgeführt. Es wurden eine F2-Population generiert sowie informative Mikrosatellitenmarker für die Genotypisierung etabliert. Die Voraussetzung für die Durchführung einer Kopplungsanalyse ist die Erstellung einer genetischen Karte jedes einzelnen Individuums. Durch die Einkreuzung der F1-Generation bestanden zahlreiche Rekombinationsmöglichkeiten, so dass jede Maus der F2-Population ein individuelles genetisches Muster aufwies. Um das Genom der F2-Mäuse detailliert kartieren zu können, wurden Mikrosatellitenmarker ausgewählt, die einen Längenpolymorphismus zwischen dem DBA/1J und dem FVB/N Mausstamm aufwiesen (informative Marker), der durch PCR mit entsprechenden Primern detektiert werden konnte (siehe auch 2.2.2).

Für diese Arbeit wurden 132 informative Mikrosatellitenmarker verwendet, welche ca. 94% des Mausgenoms abdeckten. Die durchschnittliche Distanz zwischen zwei Markern betrug 11,22 centi Morgan (cM), wobei der minimale Abstand zwischen zwei Markern 5,1 cM und der maximale Abstand 27 cM betrug.

### **3.2.2 Identifizierung der die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in der Frühphase der CIA kontrollierenden QTLs**

Die Kopplungsanalyse durch die Kombination der Genotypdaten aus dem Genom-Screening und der Phänotypdaten aus der mikrozirkulatorischen Analyse mittels IVM (Kap. 3.1) (Fraktion rollender Leukozyten, adhärenente Leukozyten, FCD, kapillarer Durchmesser, V-RBC)

erbrachte neue QTLs auf Chromosomen 8, 9, 13, 17 und 18. Eine Zusammenfassung der identifizierten QTLs ist in Tabelle 2 dargestellt.

QTL	s. level $p < 0.05$	Peak Chromosome	Closest Marker (cM)	LOD score	Trait
FCD1	3.64	8	D8Mit92 (71.0)	4,75***	Funktionelle kapillare Dichte
FCD2	3.6	18	D18Mit22 2 (6.0)	2,6*	Funktionelle kapillare Dichte
Sticker1	3.71	8	D8Mit92 (71.0)	3,75**	Adhärente Leukozyten
Sticker2	3.71	17	D17Mit19 7 (9.65)	3.67*	Adhärente Leukozyten
Sticker3	3.6	18	D18Mit22 2 (6.0)	3.1*	Adhärente Leukozyten
V-RBC 1	3.6	9	D9Mit151 (72.0)	2.3*	V-RBC
V-RBC 2	3.6	13	D13Mit16. 1 (10.0)	2.5*	V-RBC

**Tabelle 2:** Zusammenfassung der identifizierten IVM-QTLs .

\* suggestiv  $p < 0.1$

\*\* signifikant  $p < 0.05$

\*\*\* hoch signifikant  $p < 0.01$

s. level: signifikanter Level basierend auf Permutationstest mit  $n=1000$

Ein kontrollierender Locus der FCD wurde auf Chromosom 8 nachgewiesen. Die QTL zeigte einen Hinweis auf eine signifikante Kopplung an Marker D8Mit92 (logarithm of the odds (LOD) score of 4.75). Ein weiterer Locus für die FCD war auf Chromosom 18 mit suggestiver

Kopplung an Marker D18Mit22 mit einem LOD-Score von 2,6 nachweisbar. Interessanterweise waren bei dem Phänotyp adhärente Leukozyten auch die gleichen Genorte auf dem Chromosom 8 (LOD score 3,75, signifikant, siehe Figure 1 a) und dem Chromosom 18 (LOD score 3,1, suggestiv) betroffen.

Zusätzlich zu diesen Loci identifizierten wir einen dritten Genort auf Chromosom 17, der den Phänotyp adhärente Leukozyten kontrollierte. Die Messung suggeriert eine Kopplung an D17Mit197 Marker (LOD score 3,67). Es wurden ebenfalls 2 Loci für V-RBC mit suggestiver Kopplung auf den Chromosom 9 und Chromosom 13 mit jeweils LOD score von 2,3 und 2,5 nachgewiesen. Bei den Phänotypen kapillarer Durchmesser und der Fraktion rollender Leukozyten wurden keine QTL's detektiert.

### **3.2.3 Expression der potentiell in der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion involvierten Gene**

Als zweite Strategie wurde in dieser Arbeit ein Gen-basierender Ansatz bzw. Kandidatengenansatz verfolgt, um genetische Faktoren zu identifizieren, welche in der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion bei der CIA involviert sind. Auf der Grundlage unserer bisherigen publizierten und nicht publizierten experimentellen Daten wurden insgesamt 11 Gene (Cd44, Il13 $\alpha$ 1, Ccr3, Defb3, Sele, Sell, Selp, Xcl1, Il1 $\beta$ , Tnf $\alpha$  and Ifn $\gamma$ ) von uns ausgewählt, welche in der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in der Frühphase der CIA eine maßgebliche Rolle zu spielen scheinen. Die Genexpression wurde in Pfoten und/oder in Lymphknoten bestimmt. Es erfolgte in Abhängigkeit von dem Genexpressionsmuster eine TaqMan Real-Time Polymerase-Kettenreaktion. Die Normalisierung der Proben erfolgte durch die Amplifikation des Housekeeping-Gens, GAPDH. Alle Daten sind in Tabelle 3 zusammengefasst. In den Pfoten wurde bei allen selektiven Genen eine Expression detektiert. Im Vergleich dazu konnte das Gen Defb3 in Lymphknoten nicht nachgewiesen werden. Bei CD44 zeigte sich ein hoher Expressionslevel sowohl in Lymphknoten als auch in Pfoten ( $862 \pm 222$ ,  $467 \pm 134$ ). Ebenso wurde auch ein hoher Expressionslevel bei Sell ( $1199 \pm 326$ ,  $140 \pm 86$ ) beobachtet.

**Tabelle 3:** TaqMan Analyse in den Lymphknoten und den Pfoten der Tiere der F2 (DBA/1JxFVB/N)- Generation.

Gene	Expressionslevel (relativ zu GAPDH) ( x 10 <sup>3</sup> , Mittelwert ± SD)*		Chr.- Lokalisation	Gen-Titel
	LN	Gelenk		
Cd44	861.9 ± 221.8	467.1 ± 134.3	2	CD44 Antigen
Il13rα1	33.2 ± 15.4	64.0 ± 22.6	X	Interleukin 13 Receptor, alpha 1
Ccr3	4.9 ± 3.0	2.6 ± 1.9	9	Chemokine (C-C motif) Receptor, alpha
Defb3	n. d. <sup>+</sup>	1.2 ± 0.7	8	Defensin beta 3
Sele	n. m. <sup>§</sup>	11.9 ± 8.3	1	Selektin, endotheliale Adhäsionsmoleküle
Sell	1198.8 ± 325.7	140.4 ± 85.9	1	Selektin, Lymphozyten
Selp	n. m. <sup>§</sup>	18.1 ± 8.3	1	Selektin, Thrombozyten
Xcl1	n. m. <sup>§</sup>	1.3 ± 0.6	1	Chemokine (C motif) Ligand 1
IL1β	86,43±81,78	n.m. <sup>§</sup>	2	Interleukin 1 Receptor beta
Tnf α	n. m. <sup>§</sup>	68,93±38,94	17	Tumor Nekrosefaktor- alpha
Ifn γ	8,14±8,07	n. m. <sup>§</sup>	10	Interferon gamma

<sup>+</sup> n.d. = nicht detektiert

<sup>§</sup> n.m. = nicht gemessen

chr: Chromosom



### 3.2.4 Identifizierung der Genexpression-kontrollierenden QTLs

Wir nahmen an, dass die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion im frühen Stadium durch Expression bestimmter transkriptioneller Gene gesteuert wird. Um die entsprechenden Loci zu identifizieren, die die Kontrolle über diese transkriptionellen Gene ausüben, führten wir die Kopplungsanalyse durch. Hier wurden die bereits oben beschriebenen 155 F2 (DBA/1JxFVB/N)-Mäuse mit dem unterschiedlichen Expressionslevel der selektiven Genen kombiniert.

In den Gelenken wurde das Expressionslevel von 6 Genen (Ccr3, Il13 $\alpha$ 1, Dfb3, Selp, Xcl1 and Tnf $\alpha$ ) durch multiple QTLs kontrolliert. Das Expressionslevel von CD44, Sell und Sele ergab keine Kopplung zu irgendwelchen Markern, obwohl CD44 und Sell eine hohe relative Expression (467,1 und 140,4, Tab.3) zeigten. Im Gegensatz dazu war die Expression von denjenigen Genen, die eine Verknüpfung mit Markern zeigten, relativ niedrig (1,2-68,9, Tab. 4). Zwei die Expression kontrollierenden Loci für Selp wurden identifiziert. Ein Locus lag auf dem Chromosom 2 mit einem signifikanten LOD-Score von 4,01. Der zweite lag auf dem Chromosom 16 mit einem hochsignifikanten LOD-Score von 6,01. Das Expressionslevel von Ccr3, einem Chemokin-Rezeptor auf Chromosom 9, wurde durch zwei Loci kontrolliert: ein Locus auf Chromosom 1 (suggestiv, LOD-Score 3,02), der andere auf Chromosom 7 mit einem hochsignifikanten LOD-Score von 5,29. Die Expression von Defb3 wurde durch Loci auf dem Chromosom 15 (suggestiv, LOD-Score 2,54) und dem Chromosom 16 (suggestiv, LOD-Score 3,34) kontrolliert. Der Locus auf dem Chromosom 15 kartierte eine Region, wo sich mehrere bekannten QTLs (Cia26, Cia30, Cia31, Cia32 und Cia38) befinden, die bei der Arthritis involviert sind. Es wurden weitere Loci auf dem Chromosom 17, 15 und 6 als suggestiv entdeckt. Diese steuerten die Expressionslevel der Gene Il13 $\alpha$ , TNF $\alpha$  und Xcl1n, welche ebenfalls bei der CIA involviert sind.

<b>Gene</b>	s. level p<0.05	peak1 chr	closest marker (cM)	LOD score	peak2 chr	closest marker (cM)	LOD score	peak3 chr	closest marker (cM)	<i>LOD</i> score
Selp	3.68	2	D2Mit395.1 (66.9)	2.47*	16	D16Mit138 (31.0)	6.01***			
Ccr3	3.64	1	D1Mit217.1 (64.1)	3.26*	7	D7Mit248.1 (27.8)	5.29***	10	D10Mit14.1 (65.0)	2.52*
Defb3	3.80	15	D15Mit252 (15.0)	2.67*	16	D16Mit138 (45.0)	3.34*			
Il13 $\alpha$ 1	3.60	17	D17Mit80.1 (29.4)	2.49*						
Xcl1	3.73	6	D6Mit116.1 (5.5)	2.91*						

**Tabelle 4:** LOD-Score der Kopplungsanalyse bei Genexpression in Gelenken

\* suggestiv p<0.1

\*\*\* hoch signifikant p<0.01

s. level: signifikantes Level basierend auf Permutationstest mit n=1000

chr: Chromosom

In Lymphknoten wurde die Expression von CD44, Il13 $\alpha$ 1, CCR3 und Il1 $\beta$  von mehreren QTLs (Tabelle5) gesteuert. Die Expression von CD44 wurde von den Loci auf Chromosom 5 mit einem LOD-score von 3,02 und auf Chromosom 2 mit einem LOD-Score von 2,47 kontrolliert. Der Locus von Il13 $\alpha$ 1 befand sich auf Chromosom 15 mit einem LOD-Score von 2,60. Im Gegensatz zu den Gelenken wurden die Expression von CCR3 in Lymphknoten von Loci auf dem Chromosom 8 (LOD-Score 3.15) und dem Chromosom 12 (LOD score 2,97) gesteuert. Die Expression von Sell zeigte eine Kopplung an den Marker D1Mit424 mit einem LOD-Score von 2.91. Der Locus zur Kontrolle der Expression von Il1 $\beta$  bildete sich auf dem Chromosom 2 mit einem LOD-Score von 2,82 ab.

Wenn wir die identifizierten QTLs für die Expression der selektiven Gene in den Lymphknoten mit den vorbeschriebenen QTLs in der Literatur vergleichen, dann sehen wir

eine Übereinstimmung der Expressions-QTL von CD 44 mit Cia14, der Expressions-QTL von Il13 $\alpha$ 1 mit Cia30 und Cia34 und der Expressions-QTL von Sell mit Cia9.

Gene	s. level p<0.05	peak1 chr	closest Marker (cM)	LOD score	peak2 chr	closest Marker (cM)	LOD score
Ccr3	3.62	8	D8Mit33 (45.0)	3.15*	12	D12Mit60.1 (16.0)	3.15*
Cd44	3.58	5	D5Mit31 (78.0)	2.67*			
Il13 $\alpha$ 1	3.58	15	D15Mit13.1 (6.7)	2.60*			
Sell	3.69	1	D1Mit424 (81.6)	3.19*			

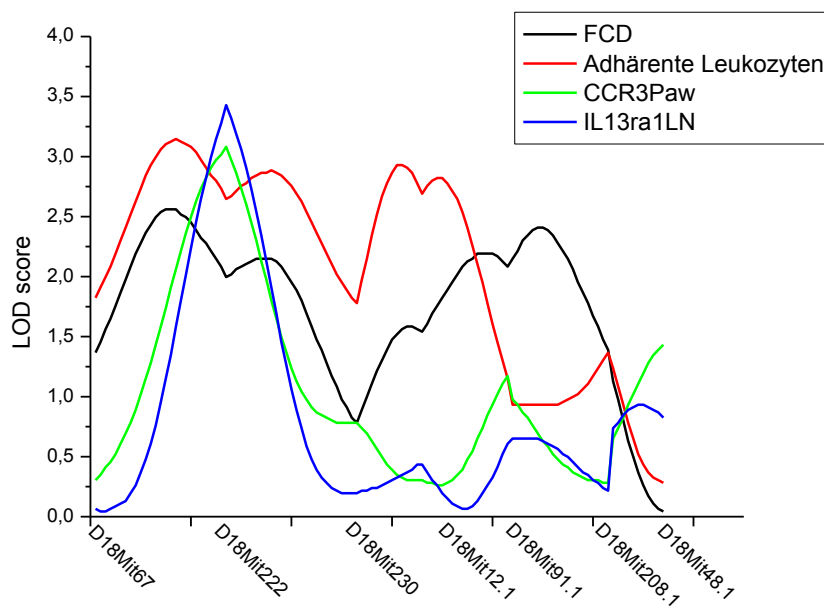
**Tabelle 5.** LOD-score der Kopplungsanalyse bei Genexpression in Lymphknoten

\* suggestiv p<0.1

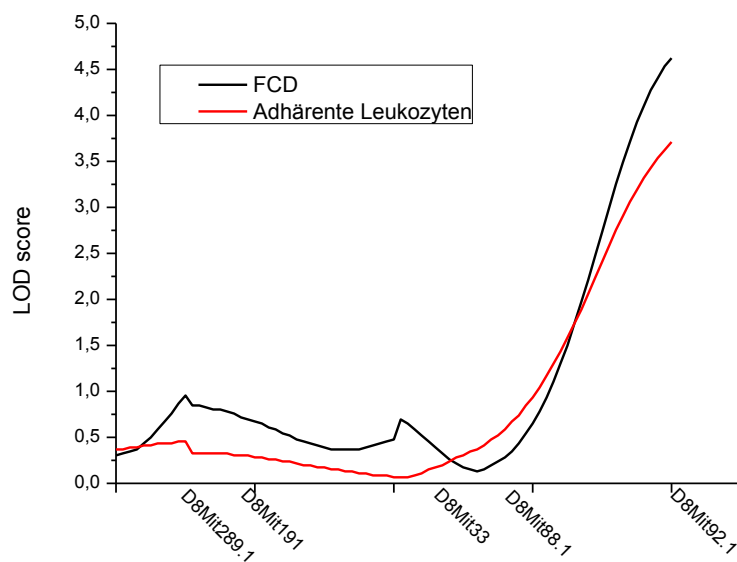
s. level: signifikantes Level basierend auf Permutationstest mit n=1000

chr: Chromosom

In der Abbildung 3-4/5 wurde die Beziehung zwischen den Phänotypen auf den Chromosomen 18 und 8 durch das Log-likelihood Areal dargestellt. Die Log-Likelihood-Werte wurden durch QTX Map Manager Software bestimmt. LOD Scores sind auf der y-Achse dargestellt und die Positionen der Marker Loci entlang der Chromosomen sind auf der x-Achse gegeben. In der Abbildung 3-4 wurden die QTLs gezeigt, die die FCD, adhärente Leukoyzten, die Expression von CCR3 in den Pfoten und die Expression von IL13 $\alpha$ 1 kontrollieren. Diese befinden sich alle in derselben genomischen Region des Chromosoms 18. In der Abbildung 3-5 sahen wir die FCD und Sticker kontrollierenden QTLs, die in derselben genomischen Region auf Chromosom 8 nachweisbar sind.



**Abbildung 3-4.** Die QTLs von FCD, adhärenzten Leukozyten, der Expression von CCR3 in den Pfoten und der Expression von IL13 $\alpha$ 1 befinden sich alle in derselben genomischen Region des Chromosoms 18.



**Abbildung 3-5.** QTLs von FCD und adhärenzten Leukozyten sind in derselben genomischen Region auf Chromosom 8.

## 4. Diskussion

Die RA des Menschen gehört zu den chronisch-entzündlichen Systemerkrankungen. Bei der Auslösung und Unterhaltung der entzündlichen Prozesse der RA spielen proinflammatorische Zytokine als Botenstoffe eine Schlüsserolle, mit deren Hilfe die Entzündungszellen miteinander kommunizieren. Auch bei immunologischen Prozessen spielen Zytokine eine große Rolle. Die modifizierte Zytokinproduktion im Sinne der geänderten Up-/Downregulation scheint dabei sehr wichtig in der Entstehung der RA zu sein.

Die inflammatorischen Zytokine, wie IL-1 und TNF- $\alpha$ , spielen eine große Rolle bei Autoimmunerkrankungen, indem sie zu einer Up-Regulation der Antigen-Präsentation führen. Neben der Regulation der Bildung von IL-1 und vieler anderer Zytokine dieser Gruppe (z. B. IL-6, IL-8) steigert TNF- $\alpha$  die Expression der intrazellulären und vaskulären Adhäsionsmoleküle (ICAM, VCAM). Außerdem werden Fibroblasten sowie Chondrozyten durch TNF- $\alpha$  aktiviert. Dabei scheint die Wirkung der Zytokine kaskadenartig vermittelt zu werden. Feldmann et al. fand 1996 Hinweise auf diese Kaskade durch eine zusätzliche Gabe von anti-TNF  $\alpha$ -Antikörper bei Zellkulturen in rheumatoiden Gelenken. Es zeigte sich eine erhebliche Reduktion der Produktion von anderen pro-inflammatorischen Zytokine, wie IL-1, GM-CSF, IL-6 und IL-8. Nach Blockade der IL-1-Wirkung am Zielort durch IL-1-Rezeptorantagonisten wurden IL-6 und IL-8 weniger produziert. Die Konzentration von TNF- $\alpha$  blieb aber unverändert. Die Expression von anti-inflammatorischen Zytokinen im rheumatoiden Gelenk wird auch intensiv erforscht. Es liegen hohe Konzentrationen an TGF- $\beta$  und IL-10 sowohl in der latenten RA als auch der aktivierten RA vor (Fava et al, 1989; Wahl, 1994, Katsikis et al, 1994). Im Gegensatz dazu wird nur ganz wenig IL-4 produziert, vermutlich spielt nur der Th1-Typ von T-Zellen eine gewisse Rolle im rheumatoiden Gelenk. In den rheumatoiden Gelenken finden sich vermehrt auch die Zytokin-Inhibitoren wie IL-1-Rezeptorantagonisten und soluble-TNF-Rezeptorantagonisten (Reviewed by Feldmann et al, 1996). Bei der RA, evtl. auch bei anderen chronischen Entzündungen, zeigten sich 2 wichtige Seiten in der Kaskade. Zum einen liegt TNF- $\alpha$  an der Spitze der pro-inflammatorischen Kaskade, zum anderen vermehren sich in einer chronischen Entzündung auch viele anti-inflammatorische Mediatoren. Durch das Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren zugunsten der pro-inflammatorischen Mediatoren entsteht dann die rheumatoide Synovialveränderung.

Die proinflammatorischen Zytokine aus Fibroblasten und Makrophagen, so zum Beispiel TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 und GM-CSF, werden im rheumatoiden Synovium verstärkt produziert (Firestein et al, 1990). Solche Zytokine aktivieren einerseits knorpelzerstörende Substanzen, wie Serin-Proteasen, Kathalysin und Matrixmetalloproteinasen (MMP). Unter den MMPs sind es u.a. Stromelysin (MMP3) und die Kollagenase (MMP1), die einen großen Anteil an der Gelenkzerstörung haben (MacNaul et al, 1990). Andererseits führen Zytokine zur Stimulation der Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM, VCAM), welche eine Anhaftung des Synoviums an Knorpel und Knochen verursachen können (Cunnane et al, 1998). Im Gegensatz dazu werden die T-Zell-Zytokine IL-2, IL-4 und IFN- $\gamma$  nur in geringen Mengen produziert (Firestein et al, 1990), obwohl die aktivierten T-Helfer-Zellen in großer Zahl im Synovium existieren. Über die genaue Wirkung, die die T-Zellen bei der RA ausüben, wurde bereits seit längerer Zeit diskutiert. Trotz intensiver Erforschung bleiben immer noch viele Unklarheiten über die kausalen Zusammenhänge und die exakten Entstehungsmechanismen der RA. Es handelt sich um eine komplexe Erkrankung, zu deren Ausprägung sowohl Umweltfaktoren als auch genetische Ursachen beitragen.

Aufgrund der Heterogenität der humanen Population und der erheblichen Variabilität an Umweltfaktoren ist daher bei der Erforschung der Einsatz von Inzuchttieren in etablierten Modellen notwendig. Die Tiere werden in einer kontrollierten Umgebung gezüchtet und die genetische Diversität kann auch reduziert werden.

## **4.1 Diskussion der Methoden**

### **4.1.1 CIA**

Die medizinische Erforschung von Autoimmunerkrankungen ist auf Tiermodelle angewiesen. Dabei sind Modelle mit Mäusen zur genetischen, immunologischen und umweltbedingten Fragestellung etabliert. Durch die höhere Verfügbarkeit wird die Sammlung von invasiven und mechanistischen Daten, welche die bisherigen Kenntnisse zur RA erweitern, vereinfacht. Die Mausmodelle zeigen weiterhin klinische und histologische Ähnlichkeit zu menschlichen Autoimmunerkrankungen. Das dabei heute meist verwendete und etablierte Mausmodell für rheumatoide Arthritis ist die CIA.

Die CIA zeichnet sich durch eine hohe Übereinstimmung mit den klinischen und histopathologischen Veränderungen der RA aus. Ca. 3-4 Wochen nach der Immunisierung mit Kollagen Typ II (CII)/CFA entwickelt sich bei den betroffenen Tieren explosiv eine schwere

Polyarthrititis der peripheren Gelenke mit einer Progredienz der Funktionseinschränkung. Diese progredient verlaufende Phase dauert ca. 2 Wochen. Danach wird eine Plateauphase erreicht, welche als „chronische Phase“ bezeichnet wird (Jeff et al, 2001).

CIA kann mit einem autologen oder heterologen CII induziert werden. Versuche mit CI oder CIII schlugen fehl (Courtenay et al, 1980; Trentham et al, 1977). Während entweder das inkomplette (IFA) oder komplette Freund's Adjuvans (CFA) verwendet werden kann, um eine CIA an Ratten zu induzieren, erfordert die Induktion der Krankheit bei Mäusen zusätzlich die Anwesenheit von heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* zum CFA (Courtenay et al, 1980). Der Verlauf der Erkrankung ist vom Kollagentyp abhängig. Während allogen Kollagen II eine eher chronische milde Arthritis mit verzögertem Ausbruch der Erkrankung und einer reduzierter Penetranz hervorruft, induziert heterologes Kollagen II eine schwere bis erosive Arthritis. Des Weiteren ist die dreifache helikale Struktur des nativen Kollagens essentiell für die Induktion der Autoimmunerkrankung, da die denaturierte Form keine Erkrankung provozieren kann.

Zytologisch ist die CIA, wie auch die RA, charakterisiert durch eine mononukleäre Zellinfiltration, Hyperplasie der Synovialzellen, Vaskularisation, Pannusbildung, Knorpel- und Knochenzerstörung bis hin zu Ankylose und Deformation eines oder mehrerer Gelenke (Courtenay et al, 1980; Trentham et al, 1977). Im Gegensatz zur rheumatoiden Arthritis entwickeln männliche Mäuse bei der CIA deutlich häufiger klinische Symptome als die weiblichen Tiere (Jasson et al, 1989 und 1998; Holmdahl et al, 1985). Wie eingangs beschrieben wurde, stammt das erste Tiermodell mit einer Entwicklung der CIA auf Kollagen Typ II-Immunisierung von Trentham et al (1978). Dabei wurde eine Krankheitsinzidenz von 40% beobachtet. Obwohl zahlreiche Studien seit Jahrzehnten auf die Erforschung der Pathogenese der CIA fokussierten, verstehen wir leider bis heute die komplexe Pathomechanismen nur unzureichend. Das komplexe Zusammenspiel von zellulären und humoralen Immunmechanismen bestimmt die Pathologie der CIA. Immunisierung mit Kollagen-II setzt eine Entzündungskaskade mit T- und B-Zell-Aktivierung in Gang, gefolgt von einer Leukozytenmigration ins Gewebe.

Auf zellulärer Ebene sind die T-Zellen für die Immunantwort auf das fremde Kollagen-Typ II verantwortlich (Trentham et al, 1978; Stuart et al, 1979). In den Lymphknoten der Applikationsstelle wird eine T-Zell-Antwort gegenüber dem injizierten CII ausgelöst. Dabei ist wichtig, wie oben bereits beschrieben, dass das Adjuvanz *Mycobacterium tuberculosis* enthält. Es führt zu einer Differenzierung der naiven T-Zellen in INF- $\gamma$  produzierenden Th1-Zellen. Solche aktivierten T-Zellen bilden Zytokine, die entweder ihre pro-inflammatorische

Wirkung direkt ausüben oder dies über die Stimulation anderer Zellen, wie Makrophagen und Fibroblasten, bewirken. Es kommen abhängig vom Gewebe und vom Stadium der Erkrankung unterschiedliche Zytokinprofile vor. In der frühen Phase ist vorwiegend das Zytokin IFN-  $\gamma$  in den Lymphknoten meßbar, während in der späten Phasen Zytokine, wie TNF-  $\alpha$ , IL-1, IL-10 und IL-6, in den Gelenken dominieren. Der Entzündungsprozess und die Gewebeerstörung werden dadurch bestimmt (Alonzi et al, 1998; Müssener et al, 1997; Stasiuk et al, 1996). Es finden sich zahlreiche Hinweise darauf, dass bei den Mäusen des suszeptiblen H-2<sup>d</sup> MHC-Typs, wie dem DBA/1J Stamm, die Induktion der CIA durch eine überwiegende Th1-Antwort vermittelt wird. Der Prozess ist durch eine Produktion von IFN-  $\gamma$  charakterisiert. Es ist zu vermuten, dass die Etablierung der Th1-Umgebung vor allem aus der Verwendung von CFA als Adjuvans resultiert, wie in Studien gezeigt wurde, die nach Immunisierung mit CII/IFA eine deutliche Erhöhung der Th2-Antwort nachweisen konnten (Mauri et al, 1996). In der chronischen Phase der Erkrankung ist die Down-Regulation der entzündlichen Antwort dann eher mit einem Anstieg der Th2-Zellaktivität und subsequenter Remission der Erkrankung assoziiert. Während dieser Knochen- und Knorpelzerstörung kommt es zur kontinuierlichen Freisetzung von Entzündungsmediatoren, die im weiteren Verlauf den Entzündungsprozess fördern.

Die Übertragung der Arthritis ist durch Lymphozyten-Transfer von einem erkrankten Tier auf ein gesundes Tier möglich und erbringt den Beweis, dass der CIA ein antikörpervermittelter Prozess zu Grund liegt (Trentham et al, 1978). Es kommt zur Ausbildung von Antikörpern gegen das körpereigene CII, das ein grundsätzliches Element des hyalinen Gelenkknorpels ist. Jedoch korreliert eine erhöhte anti-CII Antikörperkonzentration nicht direkt mit einer erhöhten Inzidenz oder einer zunehmenden Schwere der Erkrankung. Eindeutig spielen die qualitativen Unterschiede, wie die Affinität und der Isotyp sowie die Epitopspezifität eine entscheidende Rolle, ob die CIA ausbricht oder nicht (Brand et al, 1996; Wooley et al, 1981). Insbesondere ist der Antikörperisotyp sehr wichtig. In der CIA steht der komplementfixierende IgG2a-Isotyp im Vordergrund. Der Isotypklassenwechsel zu IgG2a wird durch Th1-Zytokine gefördert. Die IgG2a-Antikörper erreichen das Gelenk und aktivieren bei CII-Bindung das Komplementsystem, welches die Aktivierung des Gefäßendothels induziert und den frühen Eintritt aktivierter T-Zellen, Monozyten und Neutrophilen wiederum vereinfacht. Die Komplementkomponente C5 wurde als ein wesentlicher Mediator innerhalb der Komplementkaskade beschrieben, da eine C5-Defizienz eine Resistenz gegenüber CIA verursacht (Bauer et al, 2004; Johansson et al, 2001; Wang et al, 2000).



In RAG-1-defizienten Mäusen („recombinant activating gene-1“), denen reife T- und B-Zellen fehlen, kann man auch eine CIA induzieren. Es erbringt den Beweis, dass auch das angeborene Immunsystem allein eine inadäquate Immunantwort und damit die Erkrankung auslösen kann (Plows et al, 1999). Es wird vermutet, dass die Bindung von CII an Diakoidindomäne-Rezeptortyrosinkinasen (DDR) eine Rolle spielt. Jedoch entsteht die CIA in RAG<sup>-/-</sup> DBA/1J-Mäusen nur verzögert. Die histopathologischen Veränderungen zeigen zeitgleich eine reduzierte Entzündungsaktivität. Diese Daten weisen wiederum indirekt auf die Bedeutung der adaptiven Immunantwort in der CIA hin.

Durch Zellinfiltration sowie freigesetzte Zytokine und andere Mediatoren entstehen im Verlauf die klinischen und histologischen Veränderungen.

Ähnlich wie in der RA zeigt sich in der CIA auch eine Assoziation mit der Expression spezifischer MHC Klasse II-Gene. Nur die Mäuse mit den MHC Klasse-II-Molekülen H2-A<sup>q</sup> (z.B. DBA/1J und B10.Q) oder H2-A<sup>r</sup> (z.B. B10.RIII) können an einer CIA erkranken (Courtenay et al, 1980; Wooley et al, 1981). Fehlen die funktionellen H-2E-Genprodukte, welche substanziell für die Präsentation protektiver Peptide sind, sind die betroffenen Mäuse ebenfalls für eine Entzündung, wie der CIA, empfindlich. Dies gilt für Mausstämme mit dem b oder q Haplotyp (Gonzalez-Gay et al, 1996; Mathis et al, 1983). Im Gegensatz zu diesen Erkenntnissen war jedoch in C57BL/6J (B6) Mäusen mit dem angeblichen CIA-resistenten H2-A<sup>b</sup>-Haplotyp eine CIA auszulösen. Bezüglich dieser Beobachtung und der Tatsache, dass es in 129/Sv Mäusen, welche ebenfalls den H2-A<sup>b</sup> Hintergrund haben und außerdem noch negativ für H-2E sind, keine CIA induziert wurde, wird eine potentielle Beteiligung von Nicht-MHC-Genen in der Pathogenese der CIA gezeigt (Campbell et al, 2000). Dabei könnten die Nicht-MHC-Gene auch die Suszeptibilität gegenüber der CIA beeinflussen. Es wird bei dem FVB/N Mausstamm angenommen, dass die Resistenz gegen die CIA auf einem Sequenzpolymorphismus im kodierenden Bereich des Tcra-V11.1-Gens sowie eine Deletion im Tcrb-V8,2 Gensegment des T-Zellrezeptors, die ebenfalls im CIA resistenten SWR-Stamm identifiziert wurde, beruht (Osman et al, 1999). Darüber hinaus kann eine Defizienz für die Komplementkomponente C5 im FVB/N-Stamm auch eine Resistenz gegenüber CIA bewirken (Bauer et al, 2004; Spinella et al, 1991; Wang et al, 2000).

Die bis jetzt durchgeführten Studien fokussierten nur auf den Zustand nach dem Auftreten von klinisch manifesten arthritischen Gelenkveränderungen. Die initiale Phase der Arthritisentwicklung und insbesondere die frühzeitige Leukozyteninfiltration ins Gewebe sind bisher nicht untersucht worden. Um diese Wissenslücke auszufüllen, konzentrierten wir unsere Beobachtungen auf die Leukozytendiapedese zu einem frühen Zeitpunkt, d.h. vor dem

Auftreten von klinischen Symptomen. Dabei konnten die synoviale Mikrozirkulation am Kniegelenk und die Leukozytenmigration im Gelenk im Modell der CIA trotz fehlender Symptome durch Einsatz von Intravitalmikroskopie erfolgreich beurteilt werden (Veihelmann et al, 1998).

#### **4.1.2 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie und chirurgische Präparation**

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie ist eine etablierte Methode für die Analyse der Organmikrozirkulation (Menger et al, 1999). Sie wurde bereits in unterschiedlichen Spezies und verschiedenen Organen angewandt, wie z.B. am Darm (Bohlen und Gore 1976), an der Niere (Steinhausen et al, 1981), am Gehirn (Villringer et al, 1989), an der Haut (Barker et al, 1989), an Skelettmuskel (Nolte et al, 1994, Menger et al, 1992), sowie am Herzen (Tillmanns et al, 1993; Vollmar et al, 1995), an der Lunge (Kuhnle et al, 1993), an der Leber (Vollmar et al, 1993, 1996) und am Pankreas (Vollmar et al, 1994). Sie bietet eine ideale Möglichkeit zur Analyse der Mikrozirkulation unter physiologischen und pathologischen Bedingungen in vivo. Nach Etablierung der Intravitalmikroskopie am Kniegelenk der Maus durch Veihelmann und Mitarbeiter (Veihelmann et al, 1998) wurde die Intravitalmikroskopie zum ersten Mal erfolgreich zur Charakterisierung der Mikrozirkulation nach einem Immunstimulus am Modell der CIA (Veihelmann et al, 1999; Szanto et al, 2004) angewandt.

Für die CIA ist diese Technik tatsächlich die Methode der Wahl, um direkt die Mikrozirkulation im „Hoffa Fett-Körper“ zu visualisieren. Mit Hilfe von fluoreszierenden Farbstoffen und der heutigen hochauflösenden Technologie wird eine quantitative Beurteilung unterschiedlicher mikrohämodynamischer Parameter ermöglicht, wie Plasmaextravasation und Leukozytendiapedese. In der akuten Phase der CIA bietet die IVM den Einblick in die ersten Schritte der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in vivo. Die regionale Durchblutung und Mikrovasomotorik können wiederholt auf quantitativer Ebene analysiert werden. Es ist möglich, dem stereotypen Ablauf der Rekrutierung und Aktivierung von Leukozyten mit Margination, Adhäsion und Migration zu differenzieren. Ferner können durch die Intravitalmikroskopie funktionelle Parameter, wie die Kapillardichte, Fließgeschwindigkeit, usw. erfasst werden. Es wurden schon dadurch umfangreiche Informationen über die Adhäsionsmoleküle gewonnen, welche eine entscheidende Rolle bei Leukozyten-Rolling, -Adhäsion und -Migration und durch das entzündete Endothel spielen (Granger et al, 1994; Johnston et al, 1995).

In unserer Studie wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie ausgewählt. Der Grund dafür

ist, dass sie als eine etablierte Technik zur direkten Analyse der Mikrohämodynamik der Schleimhaut am Kniegelenk ist. Die in vivo Fluoreszenzmikroskopie hat durch die Visualisierung des Gefäßsystems in Kombination mit der Epi-Illuminationstechnik wesentliche Vorteile gegenüber indirekten Verfahren, wie beispielsweise die Farbstofftechnik (McKeeb Olds & Stafford 1930; Elias & Petty 1953), die Thermographie (Saumet et al, 1986), die Partialdruckmessung des Gewebesauerstoffs (Conzen et al, 1988; Vollmar et al, 1992), die Mikrosphären-Technik (Zwissler et al, 1991) sowie die Laser-Doppler-Flowmetrie (Vollmar et al, 1994b; Chavez-Cartaya et al, 1995). Hinsichtlich der Entwicklung neuer therapeutischen Ansätze spielt die Beobachtung und quantitative Analyse der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion eine wesentliche Rolle.

Der anatomische Aufbau des Kniegelenkes einer Maus, insbesondere der Aufbau des Hoffa-Fettkörpers mit der Synovialzellschicht, ist ähnlich dem des Menschen. Das Volumen des Hoffa-Fettkörpers der Maus beträgt  $1\text{-}2\text{mm}^3$ . Es wird dadurch eine optimale Sicht auf das synoviale Netzwerk ermöglicht. Im Gegensatz dazu ist die Sicht auf die Synovialzellschicht bei Ratten, die über ein 6-8 mal höheres Volumen des intraartikulären Fettkörpers verfügt, deutlich schwieriger darstellbar. Durch eine einfache, schnelle chirurgische Präparation kann die Kniegelenksschleimhaut der Maus ohne Beeinträchtigung des intraartikulären Blutflusses exponiert stellen.

Jede chirurgische Intervention kann eine Aktivierung inflammatorischer Prozesse mit einer Steigerung der Mediatorausschüttung, der Gefäßpermeabilität sowie der Leukozytenadhärenz verursachen (Kirveskari et al, 2003). Daher wurden alle Tiere mit der gleichen hohen Sorgfalt und guter Präparationstechnik behandelt, um die Vergleichbarkeit und präzise Ergebnisse sicher zu leisten.

Vor der chirurgischen Präparation wurden die Tiere durch Anästhesie mittels Ketamin/Xylazin in Narkose gebracht. Ketamin ist ein Cyclohexanderivat. Im Gegensatz zu anderen Analgetika und Narkotika besteht bei Ketamin eine sogenannte „dissoziative Anästhesie“, d.h. unter weitgehend erhaltenen Schutzreflexen wird ein Verlust von Schmerzempfindung und Bewusstsein (Analgesie und Anästhesie) erzeugt.

Die vitalen Funktionen werden, wenn überhaupt, nur geringgradig beeinflusst (Carroll & Hartsfield 1996; Plumb 2003). Neben einer leichtgradig stimulierenden Wirkung auf das Herzkreislaufsystem zeigte sich eine geringe depressive Wirkung auf das Atemzentrum. Ein atemdepressiver Effekt bis hin zur Apnoe wird oft begleitet von Hypoxämie und Hyperkapnie, ist aber nur ab einer hohen Dosierung und vor allem bei i.v. Injektion von klinischer Relevanz (Carroll & Hartsfield 1996; Plumb 1999). Es wurde auch eine anti-inflammatorische Wirkung

beschrieben, welche wahrscheinlich auf eine Blockade der neutrophilen Granulozyten zurückzuführen ist (Zahler et al, 1999).

Xylazin ist ein zentraler und peripherer  $\alpha_2$ -Adrenozeptor-Agonist, was neben einer allgemeinen Muskelrelaxation auch zu einem schlafähnlichen Zustand führen kann. Dieser Zustand wirkt in der gewählten Dosierung über etwa 30 Minuten an. Daneben kann Xylazin unabhängig von seinen sedierenden Eigenschaften auch angsthemmend wirken. Eine Xylazinnarkose kann in Tieren Bradykardien (Wright 1982) mit höhergradigen AV-Blöcken (Alef & Oechtering 2003) und verminderte Ventrikelkontraktionen (Benson & Thurmon 1990) verursachen, was zur Reduktion des Herzzeitminutenvolumens führt (Muir et al, 1979).

### 4.1.3 Kopplungsanalyse

Die RA hat vielfältige auslösende und prädisponierende Faktoren. Mehrere Entzündungsmechanismen werden diskutiert. Außer Umweltfaktoren werden auch eine Vielzahl an Genen als ursächlich für die Erkrankung beschrieben. Zur Identifizierung dieser Gene wird die Kopplungsanalyse angewandt, welche den Hinweis geben kann, welche Krankheitsmerkmale mit welchen chromosomalen Abschnitten assoziiert sind.

Am Anfang des 20. Jahrhunderts entdeckten Morgen und seine Kollegen erstmals die genetische Kopplung. Sie stellt eine weit verbreitete Methode zur Detektion von Kopplungen zwischen genetischen Markern und Loci dar, die zur variablen Ausprägung eines phänotypischen Merkmals führen. Kopplung beschreibt die Vererbung eines genetischen Markers mit dem Krankheitsphänotyp innerhalb einer Familie.

In dieser Arbeit wurden die Kopplungsanalysen im Mausmodell der CIA genutzt, um die Chromosomenbereiche zu detektieren, welche die Entstehung der Erkrankung beeinflussen. Diese Strategie ist die sogenannte reverse Genetik (Holmdahl 2003), d.h. es wird versucht, die auslösenden Gene für bestimmte Krankheitsphänotypen zu entschlüsseln. In unserer Arbeit betrachteten wir die bei der CIA pathologisch veränderten Mikrozirkulationsparameter und die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion.

Eine genetische Assoziation von RA zum Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) ist bereits bekannt. Das Ziel dieser Arbeit war die Nicht-MHC Gene zu identifizieren. Daher wurden zwei Mausstämme (der Arthritis-suszeptible DBA/1J-Stamm und der Arthritis-resistente Mausstamm FVB/N), die den gleichen MHC-Haplotyp verfügen, als Parentalgeneration ausgewählt.

Eine häufig verwendete Form der genetischen Kreuzung ist die F2-Inzuchtkreuzung. Zwei parentale Inzuchtstämme werden miteinander gekreuzt, um eine genetisch homogene F1-Generation zu generieren. Durch Einkreuzen (intercross) der F1-Nachkommen entsteht die F2-Population. Durch zufällige Rekombinationsereignisse zeigt jedes Individuum der F2-Generation ein spezifisches genetisches Muster, welches mit Hilfe genetischer Marker genau kartiert werden kann. Der Vorteil von dieser Kreuzungsstrategie liegt darin, dass sie sowohl Informationen über rezessiv als auch dominant vererbte Gene liefern kann, im Gegensatz zur Rückkreuzung, welche hauptsächlich dominante Gene detektieren kann (Darvasi, 1998).

Zur Genotypisierung der Mäuse für die genomweite Kopplungsanalyse der F2-Generation wurden informative Mikrosatellitenmarker verwendet. Informative Mikrosatelliten weisen einen Längenpolymorphismus zwischen den beiden Parentalstämmen DBA/1J und FVB/N auf. Mit Hilfe der Datenbank von „The Jackson Laboratory - MGI“ ([www.informatics.jax.org](http://www.informatics.jax.org)) wurden 132 informative Mikrosatellitenmarker und die entsprechenden Primer für die genomweite Kopplungsanalyse der F2-Generation DBA/1J x FVB/N Mäuse gefunden. Die für diese Arbeit verwendeten 132 informativen Mikrosatellitenmarker decken dabei 94% des Genoms ab. Die durchschnittliche Inter-Marker Distanz beträgt 11,22 cM. Trotzdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass einige Rekombinationsereignisse nicht detektiert wurden, da es vereinzelt Distanzen zwischen Markern gab, die größer als 20 cM waren.

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

### 4.2.1 Rolle der Mikrozirkulation in der CIA

Die Gelenkinflammation ist das Hauptmerkmal der CIA. Sie ist durch vermehrte Zellinfiltration charakterisiert, welche von Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten dominiert wird. Die Aktivierung der zirkulierenden Leukozyten und ihre Interaktion mit dem Endothel mit anschließender transendothelialer Migration und Infiltration der Leukozyten ins Gewebe ist der erste und entscheidende Schritt bei der Gewebeschädigung. Im weiteren Entzündungsverlauf, einschließlich der Synovialzellhyperplasie und Pannusbildung, kommt es zum Integritätsverlust des Knorpels und schlussendlich zum kompletten Funktionsverlust des Gelenkes.

Die intravitalmikroskopische Untersuchung ist eine ideale Methode, um die Veränderung der synovialen Mikrozirkulation quantitativ zu erfassen. Es wurden Veränderungen der Mikrozirkulation nach Arthritisinduktion im Kniegelenk und im Sprunggelenk der Maus erfolgreich dokumentiert. Am Modell einer Albumin-induzierten-Arthritis wurden mikrohämodynamische Parameter und die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in der akuten, intermediären und auch in der chronischen Phase analysiert (Veihelmann et al, 1999; Schmitt-Sody et al, 2007).

Unsere intravitalmikroskopische Untersuchungen zeigten eine sehr hohe funktionelle Kapillardichte mit Werten von  $596 \pm 87 \text{ cm/cm}^2$ . Gezählt wurden nur die perfundierten Kapillaren, die an der Oxygenation und Nutrition der Gewebes beteiligt sind. Ein Stammunterschied ist bekannt (Veihelman et al, 1999). So wurde in Balb/c Mäusen in vorausgegangenen Studien eine funktionelle Kapillardichte mit Werten um  $220 \text{ cm/cm}^2$  beschrieben. Bei der RA und in anderen Arthritismodellen zeigte sich eine signifikante Steigerung der funktionellen Kapillardichte auch in frühen Stadien. Hier gilt die Neoangiogenese als Mechanismus (Koch et al, 1995; Tak et al, 1995; Stogard et al, 1999; Veihelmann et al, 1999). Während der Initiation der Arthritis wurde eine vermehrte Produktion an  $\text{TNF-}\alpha$ , NO und IL-1 gezeigt, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass diese Zytokine an der eben beschriebenen Neoangiogenese beteiligt sein könnten (Jackson et al, 1997). Zudem sahen wir eine vermehrte Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin und VCAM-1, welche auch als Angiogenesevermittler in den früheren Arthritisphasen bekannt sind (Tak et al, 1995; Koch et al, 1995). Es bleibt leider weiterhin ungeklärt, ob noch weitere

bisher nicht bekannte Mechanismen für die Zunahme der funktionellen Kapillardichte mitverantwortlich sind.

Im Modell der CIA wurde im Gegensatz dazu eine reduzierte funktionelle Kapillardichte bei DBA1/J Mäusen (Arthritis-suszeptible Mausstamm) im Vergleich zu den gesunden Kontrollmäusen dokumentiert (Gierer et al 2005). Die funktionelle Kapillardichte bei FVB/NJ Mäusen (Arthritis-resistenter Mausstamm) blieb nach Immunisierung unverändert. Als Ursache wird angenommen, dass die Veränderung auf einen erhöhten Gelenkinnendruck zurückzuführen ist. Es wurde beschrieben, dass die Leukozytenadhäsion durch Ausschüttung zytotoxischer Degranulationsprodukte zu einem Verlust der Barrierefunktion des Endothels mit nachfolgender Extravasation führt (Adams/Shaw 1993; Cowley et al, 1994). Flüssigkeit und Makromoleküle dringen ins Interstitium bzw. ins Gelenk ein, wodurch ein erhöhter interstitieller bzw. Gelenkinnendruck verursacht wird. Für eine genaue Charakterisierung der Beeinflussung der funktionellen Kapillardichte in initialen Arthritisstadien sind weitere Untersuchungen notwendig.

Ein effektiver Sauerstoffaustausch zwischen synovialen Kapillaren und der Gelenkhöhle ist für die Versorgung des Gelenkknopels sehr wichtig. Neben der funktionellen Kapillardichte spielt die Blutfließgeschwindigkeit auch eine entscheidende Rolle. Um die physiologische Funktion zu gewährleisten, muss die synoviale Blutfließgeschwindigkeit im Vergleich zu postkapillaren Venolen der quergestreiften Muskulatur oder der dorsalen Haut, ca. doppelt so hoch sein (Veihelman et al, 1998; Steinbauer et al, 1997; Lehr et al, 1993).

In Tiermodellen der CIA kommt es zu einer Reduktion der Blutfließgeschwindigkeit (Hardy et al, 1996). Nach Arthritisinduktion entstehen ein höherer Gelenkinnendruck (wie oben bereits beschrieben wurde) und auch eine vermehrte Leukozytenadhäsion, wodurch eine Zunahme des Strömungswiderstandes verursacht wird. Eine Zunahme des Strömungswiderstandes führt wiederum zu einer Reduktion der Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit (Hardy et al, 1996). Eine vorherige Studie zeigte die Reduktion der Blutfließgeschwindigkeit bei DBA/1J auf 0,83mm/s und bei FVB/N auf 0,62mm/s. In unserer Arbeit betrug die Blutfließgeschwindigkeit bei der F2-Generation  $0,72 \pm 0,28$ mm/s (Gierer et al, 2005).

Vermehrtes Leukozytenrolling und gesteigerte Leukozytenadhäsion sind Indikatoren für ein aktiviertes Immunsystem. Die Leukozytenadhäsion basiert auf eine Bindung der leukozytären  $\beta 2$ -Integrine CD11a,b/CD18 (LFA1, Mac1) an die endothelialen Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie ICAM-1, ICAM-2 und ICAM-3 (Argenbright et al, 1991; Stanley et al, 1994; Springer, 1994; de Fougères et al, 1994).

Schenkel et al. wies die Relevanz des endothelial wie leukozytär exprimierten Adhäsionsmoleküls CD99 für die transendotheliale Migration von Monozyten und Lymphozyten sowohl in vitro als auch in vivo auf (Schenkel et al, 2002). In vivo zeigten die Autoren, dass CD99 für die transendotheliale Migration von Lymphozyten notwendig ist. In vitro wurde eine Beteiligung von CD99 bei der Diapedese humaner Monozyten nachgewiesen. Des Weiteren sollen eine Reihe Adhäsionsmolekülen, die als Stabilisatoren für Endothelzellkontakte fungieren, an der Diapedese von Leukozyten beteiligt sein. Gotsch et al. zeigte, dass die Blockierung von VE-Cadherin die transendotheliale Migration von PMN in vivo steigert (Gotsch et al, 1999). Für JMA-A, ein endotheliales und epitheliales Adhäsionsmolekül, wurde mittels monoklonaler Antikörper nachgewiesen, dass es bei der transendothelialen Migration von Monozyten und PMN auch eine maßgebliche Rolle spielt (Martin-Padura et al, 1998; Del Maschio et al, 1999).

In der Frühphase der CIA sind die klinischen Symptome noch abwesend. Trotzdem wurde in der vorliegenden Studie intravitalmikroskopisch bereits eine deutliche zelluläre Immunantwort gezeigt. Es wurde gezeigt, dass in den empfindlichen Mausstämmen nach Arthritisinduktion eine signifikante Erhöhung der Interaktion von Leukozyten mit dem Gefäßendothel trotz der symptomfreien frühen Phasen besteht.

In der Studie von Veihelmann et al, wurde eine Inflammation des Kniegelenks durch intraartikuläre Albumininjektion (AIA) hervorgerufen. Die intravitalmikroskopischen Untersuchungen fanden in der akuten, intermediären und chronischen Phase der AIA statt. Es gab auch eine deutliche Diskrepanz bezüglich der festen Leukozytenadhäsion im Vergleich mit publizierten und unpublizierten Daten von unserer Arbeitsgruppe (437 Zellen/mm<sup>2</sup> versus 800-1000 Zellen/mm<sup>2</sup>, Sehnert und Gierer 2006). Dabei wurde vermutet, dass die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in der initialen präarthritischen Phasen stärker als in den aktuen Phasen ausgeprägt ist. Es wurde im Modell der AIA auch eine sehr hohe Zahl von rollenden und adhärenenten Leukozyten in der Akutphase dokumentiert. Ein kontinuierlicher Rückgang der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion wurde während dem Übergang in die chronische Phase beobachtet (Veihelmann et al, 1999). Das heißt, dass die mikrovaskuläre Adhäsion und Migration der Leukozyten bereits vor den ersten klinischen Symptomen maximal ausgeprägt ist und dann langsam mit Übergang in eine Plateauphase zurückgeht (Sehnert B et al, 2006). Diese Überlegung legt nahe, dass die therapeutischen anti-inflammatorischen Maßnahmen so früh wie möglich begonnen werden sollten.

In der chronischen Arthritis spielen viele Gene, welche hauptsächlich in die Zellteilung und –proliferation involviert sind, eine entscheidende Rolle (Ibrahim et al, 2002). Im Gegensatz



dazu scheint eine deutliche Hochregulation von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen für das frühe Krankheitsstadium verantwortlich zu sein. Die Selektine sind zwingend am Leukozytenrolling beteiligt. Anschließend sind die leukozytären Integrinen, welche durch die Bindung an ihre endothelialen Gegenrezeptoren (z.B. VCAM, ICAM) die Voraussetzung für die Leukozytenadhäsion schaffen (Springer et al, 1994; Muller et al, 2002).

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass die gesteigerte Leukozyten-Endothelzell-Interaktion nicht nur ein integraler Bestandteil der Manifestation und der Progredienz der Arthritis ist, sondern noch bei der Initiation der Erkrankung eine bedeutende Rolle spielt. Daher könnte die Identifizierung der kontrollierenden Gene, die diese pathogene Veränderung steuern, ein entscheidender Schritt in der Entwicklung einer wirksamen Therapie sein.

#### **4.2.2 Identifizierung neuer Phänotypen-und Genexpressions-QTL's**

In dieser Studie wurden phänotypische QTLs und Genexpressions-QTLs, die die Leukozyten-Endothel-Zell-Interaktion in der Frühphase der Erkrankung kontrollieren, identifiziert.

Zunächst wurden mehrere QTLs identifiziert, die die mikrovaskuläre Perfusion und entzündliche Zellantwort im Synovialgewebe beeinflussen. Zudem wurden QTLs identifiziert, welche die Expression von selektiven Genen kontrollieren, die potentiell an der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion im frühen Stadium der Arthritis beteiligt sind.

Unsere Analyse wurde an Mäusen der DBA/1J  $\times$  FVB / N F2-Generation durchgeführt, welche mit CFA und Kollagen II immunisiert wurden. In einer vorherigen Studie unserer Arbeitsgruppe zeigte sich eine Zunahme der inflammatorischen Zellreaktion in der Mikrozirkulation am Kniegelenk bei DBA/1J Mäusen im Vergleich zu FVB/N-Mäusen in der initialen Phasen der CIA (Gierer et al, 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch die Kopplungsanalyse der F2-Generation insgesamt 7 QTLs identifiziert, die verschiedene Phänotypen der CIA kontrollieren. Alle detektierten Loci wurden erstmals identifiziert und waren vorher nicht beschrieben.

Die Suszeptibilität und Resistenz der Parentalstämme DBA/1J und FVB/N gegenüber der Induktion der CIA ist in der Literatur gut beschrieben (Holmdahl et al, 1985; Osman et al, 1999). Die Inzidenz der Arthritis in dieser Studie korreliert mit publizierten Daten. So wiesen die DBA/1J Mäuse eine Inzidenz von 100 % auf, die FVB/N Tiere waren dagegen mit einer Inzidenz von 0 % komplett resistent. Die Suszeptibilität der (DBA/1J $\times$ FVB/N)F1-Nachkommen entsprach den Erwartungen und Beobachtungen in Studien mit ähnlichen

Kreuzungen (Jirholt et al, 1998; McIndoe et al, 1999; Yang et al, 1999). Ein Vergleich des Schweregrades zwischen der F2-Generation und dem parental DBA/1J Stamm zeigt signifikante Unterschiede ( $p < 0,0001$ ), was auf die Existenz protektiver FVB/N Loci hinweist (Bauer et al, 2004).

Drei detektierte QTLs dieser Studie, welche mit der Leukozytenadhäsion in der Frühphase der CIA assoziiert sind, befinden sich auf den Chromosomen 8, 17, 18. Überraschenderweise ist es nicht bekannt, dass die an der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion beteiligten Adhäsionsmoleküle, wie Selektine, CD44, usw, mit diesen Loci korrelieren. Es deutet darauf hin, dass es neue Kandidatengene gibt, die in diese Entzündungsprozesse involviert sind. Interessanterweise kontrolliert der QTL auf dem Chromosom 8 (LOD score 3,75/4,75) auch die FCD. Die FCD ist ein wichtiger Indikator für die mikrovaskuläre Perfusion und lokale Sauerstoffversorgung. Diese Ergebnisse erbringen den Beweis, dass evtl. ein Gen oder mehrere Gene existieren, die beide Phänotypveränderungen gleichzeitig kontrollieren. Mehrere potenzielle Kandidatgene kartieren auch diesen Locus, zum Beispiel die Gene der Cadherin-Familie: Cdh 11 (E-Cadherin, 46,5 cM), Cdh 13 (T-Cadherin, 65 cM) und Cdh 15 (M-Cadherin, 67cM). Cadherine sind die wesentlichen Adhäsionsmoleküle, die typischerweise eine calcium-abhängige Adhäsion zwischen Zellen des gleichen Typs im Gewebe vermitteln (Takeichi M et al, 1990, Valencia et al, 2004, Kiener et al, 2005, Lee DM et al, 2007, Ivanov D et al, 2004, Shiina K et al, 2007).

Die Analyse der Expressions-QTLs wurde für 11 Gene durchgeführt. Es wurde eine unterschiedliche Expression von 11 Genen in der Frühphase der CIA gezeigt (unveröffentlichte Daten, Gierer et al; Yu et al). Sieben Gene waren trans-kontrolliert. Zwei waren Cis-kontrolliert (Sell und Il1 $\beta$ ). Es gab noch 2 Gene (Sele und INF $\gamma$ ), für die keine kontrollierten Loci gefunden wurden. Einige Gene hatten auch zwei ExpressionsQTLs gezeigt. Zwei QTLs, die die Expression von P-Selektin im Sprunggelenk kontrollieren, sind überlappend mit bekannten Loci aus früheren Studien. Ein Locus davon liegt auf Chromosom 2 (Trmq3) und zeigte eine Kopplung an CD4/CD8-Ratio und den Phänotypen von Ausbruch und Schweregrad der Krankheit. Der auf Chromosom 16 (Lp1) befindliche Locus kontrolliert auch die Lymphozyten-Proliferation. Bisherige Studien deckten auf, dass die endothelialen Adhäsionsmoleküle E-Selektin und P-Selektin entscheidenden Einfluß auf die Vermittlung der Zell-Zell-Interaktion haben (Kunkel & Ley 1996; Kunkel et al, 2000, Issekutz et al, 2001).

P-Selektin wird auf Thrombozyten und Endothelzellen exprimiert und kann innerhalb von Sekunden nach Stimulation z.B. durch Thrombin aus den  $\alpha$ -Granula mobilisiert werden

(Stenberg et al, 1985; Gawaz 2001). Bei Patienten mit akuter Arthritis ist eine erhöhte Serumkonzentrationen von P-Selektin bekannt (Ertenli et al, 1998; Veale et al, 1998; De Benedetti et al, 2000). Intravitalmikroskopisch wurde im Tiermodell gezeigt, dass P-Selektine in der akuten Phase der Albumin-induzierten-Arthritis durch vermehrte Thrombozyten-Endothelzell-Interaktion das Rollen von neutrophilen Granulozyten auf aktivierten Thrombozyten vermitteln. Dadurch wird im Verlauf auch die feste Endotheladhäsion der Granulozyten begünstigt (Schmitt-Sody et al, 2007a/b).

Die Selektin-vermittelte Zell-Zell-Interaktion ist eine Voraussetzung der späteren Adhäsion und Transmigration der Leukozyten und ist wahrscheinlich auch in der selektiven Migration von CD4- und CD8-positiven Zellen involviert (Soringer et al, 1995; Lasky et al, 1995; Kansas et al, 1996; Bonnacchi et al, 1998; Sallusto et al, 1998; Cerwenka et al, 1999; Vestweber et al, 1999). Es ist interessant zu spekulieren, dass die verschiedenen Migrationseigenschaften von unterschiedlichen T-Zellpopulationen wichtig für die effiziente Regulierung der Immunreaktion, zum Beispiel der regulatorischen T-Zell-Differenzierung und Entwicklung, sind (Kohm et al, 2003).

Ein weiteres Adhäsionsmolekül, das bei der Entzündungsentstehung eine Rolle spielt, ist das von Leukozyten exprimierte CD44. CD44 fördert das Leukozyten-Rolling im entzündlichen Gewebe (DeGrendele et al, 1997; Pure E. et al, 2001). Diese Annahme wird durch die Beobachtung an CD44-Knockout-Mäusen gestützt, bei denen der Verlust von CD44 die Rückführung der Lymphozyten in die peripheren Lymphknoten während der Inflammation zu ermöglichen scheint (Stoop et al, 2002; Mckallip et al, 2002).

Die Expression von CD44 wird durch einen Locus, der auf Chromosom 5 liegt, kontrolliert. Der Locus von Cia 14 wurde auch in diesem Bereich identifiziert (Yu et al, 2007; Glant et al, 2004). Dies deutet an, dass ein QTL wahrscheinlich existiert, welches die Krankheit durch die Expression von CD44 in Lymphknoten kontrolliert.

Zusammenfassend ist diese Arbeit nach unserer Kenntnis die erste Studie, welche die kontrollierenden QTLs (Quantitative Trait Loci) in der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in der Frühphase der CIA präsentiert. Wir identifizierten auch besondere QTLs, welche die Expression von an der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion beteiligten Genen beeinflussen. Die meisten identifizierten Expressions-QTLs waren trans-reguliert. Dies gibt den Hinweis darauf, dass polymorphe Gene (Transkriptionsfaktoren oder andere) eventuell die größeren transkriptionellen Netzwerke beeinflussen, die auch in der Pathogenese der Arthritis involviert sind.

## LITERATURVERZEICHNIS

Abbassi O, Kishimoto TK, McIntire LV, Anderson DC, Smith CW. E-selectin supports neutrophil rolling in vitro under conditions of flow. *J Clin Invest* 1993;92:2719-30

Adams DH, Shaw S. Leukocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. *Lancet* 1993;343:831-6

Aho K, Koskenvuo M, Tuominen J, Kaprio J. Occurrence of rheumatoid arthritis in a nationwide series of twins. *J Rheumatol* 1986;13: 899-902

Alef M, Oechtering G, Horzinek CM, Schmidt V, Lutz H. Krankheiten der Katze. Anästhesie, Enke Verlag Stuttgart 2003;3:615-48

Alon R, Feizi T, Yuen CT, Fuhlbrigge RC, Springer TA. Glycolipid ligands for selectins support leukocyte tethering and rolling under physiologic flow conditions. *J Immunol* 1995;154: 5356-5366

Alonzi T, Fattori E, Lazzaro D, Costa P, Probert L, Kollias G, De Benedetti F, Poli V, and Ciliberto G. Interleukin 6 Is Required for the Development of Collagen-induced Arthritis. *Journal of Experimental Medicine* 1998;187:461

Arai K, Yamamura S, Hanyu T, Takahashi HE, Umezu H, Watanabe H, et al. Extrathymic differentiation of resident T cells in the joints of mice with collagen-induced arthritis. *J Immunol* 1996; 157: 5170-7

Arbones ML, Ord DC, Ley K, Ratech H, Maynard Curry C, Otten G, Capon DJ, Tedder TF. Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L- selectin-deficient mice. *Immunity* 1994;1: 247-260

Argenbright LW, Letts LG, Rothlein R. Monoclonal antibodies to the leukocyte membrane CD18 glycoprotein complex and to intercellular adhesion molecule-1 inhibit leukocyte-endothelial adhesion in rabbits. *J Leukoc Biol* 1991;49: 253-257

Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31: 315-24

Ashton-Rickardt PG, Van Kaer L, Schumacher TN, Ploegh HL, Tonegawa S. Repertoire-determining role of peptide in the positive selection of CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunol Rev* 1993;135:157-82

- Baatz H, Steinbauer M, Harris AG, Krombach F. Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G. *Int J Microcirc Clin Exp* 1995;15:85-91
- Bagge U, Karlsson R. Maintenance of white blood cell margination at the passage through small venular junction. *Mic Rec* 1980;20: 92-95
- Barker JH, Hammersen F, Bondar I, Uhl E, Galla TJ, Menger MD, Messmer K. The hairless mouse ear for in vivo studies of skin microcirculation. *Plast Reconstr Surg* 1989b;83:948-59
- Bauer K, Yu X, Wernhoff P, et al. Identification of new quantitative trait loci in mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:3721-8
- Benson GJ, Thurmon JC. Intravenous anesthesia. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1990;6:513-28
- Bohlen HG, Gore RW. Preparation of rat intestinal muscle and mucosa for quantitative microcirculatory studies. *Microvasc Res* 1976;11:103-10
- Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, et al. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 1998;187:129-34
- Brand DD, Marion TN, Myers LK, Rosloniec EF, Watson WC, Stuart JM, Kang AH. Autoantibodies to murine type II collagen in collagen-induced arthritis: a comparison of susceptible and nonsusceptible strains. *J Immunol* 1996;157:5178
- Brand DD, Kang AH, Rosloniec EF. Immunopathogenesis of Collagen-induced arthritis. *Springer Seminars in Immunopathology* 2003;25:3
- Brennan FM, Chantry D, Jackson A, Maini R, Feldmann M. Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1989;2(8657):244-7
- Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991;67:1033-6
- Campbell IK, Hamilton JA, Wicks IP. Collagen-induced arthritis in C57BL/6 (H-2b) Mice: new insights into an important disease model of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 2000;30:1568
- Carman CV, Springer TA. A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol* 2004;167: 377-388
- Caro CG, Pedley TG, Schroter RC, und Seed WA. The mechanics of the circulation. New York – Toronto: Oxford University Press, 1978.
- Carroll GL und Hartsfield SM. General anesthetic techniques in ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1996;12:627-61

Cerwenka A, Morgan TM, Harmsen AG, et al. Migration kinetics and final destination of type 1 and type 2 CD8 effector cells predict protection against pulmonary virus infection. *J Exp Med* 1999;189:423–34

Chávez-Cartaya RE, Romero PR, Jamieson NV. Haemoglobin saturation in the rat liver after ischaemia and reperfusion: Study using a laser photometry technique and correlation with changes in liver tissue blood flow. *Eur Surg Res* 1995;27:82-92

Churchill GA, Doerge RW. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 1994;138: 963-71

Conzen P, Hobbhahn J, Goetz AE, Habazettl H, Granetzny T, Peter K, Brendel W. Splanchnic oxygen consumption and hepatic surface oxygen tensions during isoflurane anesthesia. *Anesthesiology* 1988;69:643-51

Corthay A, Johansson A, Vestberg M, Holmdahl R. Collagen-induced arthritis development requires alpha beta T cells but not gamma delta T cells: studies with T cell-deficient (TCR mutant) mice. *International Immunol* 1999;11:1065

Corthay A, Johansson A, Vestberg M, Holmdahl R. Collagen-induced arthritis development requires alpha beta T cells but not gamma delta T cells: studies with T celldefizient (TCR mutant) mice. *Int Immunol* 1999;11:1065-73

Courtenay JS, Dallmann MJ, Dayan AD, Martin A, Mosedale B. Immunisation of against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature* 1980;283:666-8

Cowley HC, Heney D, Gearing AJ, Hemingway I, Webster NR Increased circulating adhesion molecule concentrations in patients with systemic inflammatory response syndrom: A prospective cohort study, *Crit Care Med* 1994; 22:651-657

Cunnane G, Hummel KM, Muller-Ladner U, Gay RE, Gay, S. Mechanism of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 1998;46:1

Cush JJ, Lipsky PE et al. Phenotypic analysis of synovial tissue and peripheral blood lymphocytes isolated from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:1230-8

Darvasi A. Experimental strategies for the genetic dissection of complex traits in animal models. *Nat Genet* 1998;18:19-24

De Benedetti F, Vivarelli M, Pignatti P, Oliveri M, Massa M, Pistorio A, Martini A. Circulating levels of soluble E-selectin, P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 in patients with juvenile idiopathic arthritis. *J Rheumatol* 2000;27:2246-50

De Fougerolles AR, Stacker SA, Schwarting R, Springer TA. Characterization of ICAM-2 and evidence for a third counter-receptor for LFA-1. *J Exp Med* 1994;174: 253-267

De Fougerolles AR, Qin X, Springer TA. Characterization of the function of intercellular adhesion molecule (ICAM)-3 and comparison with ICAM-1 and ICAM-2 in immune responses. *J Exp Med* 1994;179: 619-629

De Grendele HC, Estess P, Siegelman MH. Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. *Science* 1997;278:672–5

Del Maschio A, De Luigi A, Martin-Padura I, Brockhaus M, Bartfai T, Fruscella TP, Adorini G, Martino G, Furlan R, De Simoni MG, Dejana E. Leukocyte recruitment in the cerebrospinal fluid of mice with experimental meningitis is inhibited by an antibody to junctional adhesion molecule (JAM). *J Exp Med* 1999;190: 1351-1356

Delves PJ und Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000;343:37-49

Delves PJ und Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* 2000; 343:108-17.

Doerge RW. Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nat Rev Genet* 2002;3: 43-52

Elias H, Petty D. Terminal distribution of the hepatic artery. *Anat Rec* 1953;116:9-17

Ertenli I, Kiraz S, Arici M, Haznedaroglu IC, Calgüneri M, Celik I, Kirazli S. P-selection as a circulating molecular marker in rheumatoid arthritis with thrombocytosis. *J Rheumatol* 1998;25:1054-8

Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol* 1996;14:397–440

Firestein GS, Alvaro-Gracia JM, Maki, R. Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1990;144:3347

Firestein, GS. Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum* 1996;39:1781

Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003;423:356-61

Flint J, Valdar W, Shifman S, Mott R. Strategies for mapping and cloning quantitative trait genes in rodents. *Nat Rev Genet* 2005;6:271-86

Frucht DM, Aringer M, Galon J, Danning C, Brown M, Fan S, Centola M, Wu CY, Yamada N, El Gabalawy H, and O'Shea JJ. Stat4 is expressed in activated peripheral blood monocytes, dendritic cells, and macrophages at sites of Th1-mediated inflammation. *J Immunol* 2000;164:4659

Gaehtgens P, Ley K, Pries AR, Mueller R. Mutual interaction between leukocytes and microvascular blood flow. *Prog Appl Microcirc* 1985;7:15-28

Gawaz M. Blood Platelets. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 2001

Gierer P, Ibrahim S, Mittlmeier T, Koczan D, Landes J, Gradl G, Vollmar B. Gene expression profile and synovial microcirculation at early stages of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005;7:868-76

Glant TT, Finnegan A, Mikecz K. Proteoglycan-induced arthritis: immune regulation, cellular mechanisms and genetics. *Crit Rev Immunol* 2003;23:199-250

Glant TT, Adarichev VA, Nesterovitch AB, et al. Disease-associated qualitative and quantitative trait loci in proteoglycan-induced arthritis and collagen-induced arthritis. *Am J Med Sci* 2004;327

Gonzalez-Gay MA, Zanelli E, Khare SD, Krco CJ, Griffiths MM, Luthra HS, et al. H2-A polymorphism contributes to H2-Ebeta-mediated protection in collagen-induced arthritis. *Immunogenetics* 1996;44:377-84

Gotsch U, Borges E, Bosse R, Boggemeyer E, Simon M, Mossmann H, Vestweber D. VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J Cell Sci* 1997;110: 583-588

Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol* 1994;55:662-75

Häder DP et al, Risks of enhanced solar ultraviolet radiation for aquatic ecosystems. In: Round FE&DJ Champman (eds) *Progress in phycological research* 1993;1-45

Hardy J, Bertone AL, Muir WW. Joint pressure influences synovial tissue blood flow as determined by coloured microspheres. *J Appl Physiol* 1996;80:1225-32

Harell GS, Corbet AB, Dickhoner WH, Bradley BR. The intraluminal distribution of 15-micrometer-diameter carbonized microspheres within arterial microvessels as determined by vital microscopy of the golden hamster cheek pouch. *Microvasc Res* 1979;18: 384-402

Healy JJ, Goodnow CC. Positive versus negative signaling by lymphocyte antigen receptors. *Annu Rev Immunol* 1998;16: 645-70

Hogg N und Berlin C. Structure and function of adhesion receptors in leukocyte trafficking. *Immunol. Today* 1995;16: 327-330

Hogquist KA, Gavin MA, Bevan MJ. Positive selection of CD8+ T cells induced by major histocompatibility complex binding peptides in fetal thymic organ culture. *J Exp Med* 1993;177:1469-73.

Holmdahl R, Jansson L, Gullberg D, Rubin K, Forsberg PO, Klareskog L. Incidence of arthritis and autoreactivity of anti-collagen antibodies after immunization of DBA/1 mice with heterologous and autologous collagen II. *Clin Exp Immunol* 1985;62:639

Holmdahl R, Anderson M, Goldschmidt TJ, Gustafsson K, Janosson L, Mo JA. Type II collagen autoimmunity in animals and provocations leading to arthritis. *Immunol Rev* 1990;118:193-232

Holmdahl R, Andersson M, Goldschmidt TJ, Gustafsson K, Jansson L, Mo JA. Type II collagen autoimmunity in animals and provocations leading to arthritis. *Immunol Rev* 1990a; 118:193-232



Holmdahl R, Jansson L, Larsson A, Jonsson R. Arthritis in DBA/1 mice induced with passively transferred type II collagen immune serum. Immunohistopathology and serum levels of anti-type II collagen auto-antibodies. *Scand J Immunol* 1990b;31:147-57

Holmdahl R. Dissection of the genetic complexity of arthritis using animal models. *J Autoimmun* 2003;21:99-103

Issekutz AC, Mu JY, Liu G, Melrose J, Berg EL. E-selectin, but not P-selectin, is required for development of adjuvant-induced arthritis in the rat. *Arthritis Rheum* 2001;44:1428-37

Ivanov D, Philippova M, Allenspach R, et al. T-cadherin upregulation correlates with cell-cycle progression and promotes proliferation of vascular cells. *Cardiovasc Res* 2004;64:132–43

Jackson JR, Seed MP, Kircher CH, Willoughby DA, Winkler JD. The codependence of angiogenesis and chronic inflammation. *FASEB J* 1997;11:457-65

Janeway CA, Travers P. *Immunologie* 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford 1997:213

Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216

Janossy G, Panayi G, Duke O, Bofill M, Poulter LW, Goldstein G. Rheumatoid arthritis: a disease of T-lymphocyte/macrophage immunoregulation. *Lancet* 1981;2:839-42

Jansson L, and Holmdahl R. Oestrogen induced suppression of collagen arthritis. IV: Progesterone alone does not affect the course of arthritis but enhances the oestrogen-mediated therapeutic effect. *J Rep Immunol* 1989;15:141

Jansson L, Holmdahl R. Estrogen-mediated immunosuppression in autoimmune diseases. *Inflamm Res* 1998;47:290-301

Jirholt J, Cook A, Emahazion T, Sundvall M, Jansson L, Nordquist N, Petersson U, Holmdahl R. Genetic linkage analysis of collagen-induced arthritis in mice. *Eur J Immunol* 1998;28:3321-8

Johansson AC, Hansson AS, Nandakumar KS, Backlund J, Holmdahl R. IL-10-deficient B.10.Q mice develop more severe collagen-induced arthritis, but are protect from arthritis induced with anti-type II collagen antibodies. *J Immunol* 2001;167:3505-12

Joseph L, Lapid S, Sukhatme V. The major ras induced protein in NIH3T3 cells is cathepsin L. *Nucleic Acids Res* 1987;15:3186

Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 1996;88:3259–87

Kappler JW, Roehm N, Marrack P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 1987;49:273-80

Katsikis PD, Chu CQ, Brennan FM, Maini RN, Feldmann M. Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 1994;179:1517-27

Kiener HP, Brenner MB. Building the synovium: cadherin-11 mediates fibroblast-like synoviocyte cell-to-cell adhesion. *Arthritis Res Ther* 2005;7:49–54

Kim MB, Sarelius IH. Regulation of leukocyte recruitment by local wall shear rate and leukocyte delivery. *Microcirculation* 2004;11:55-67

Kirveskari J, Helinto M, Saaren-Seppala H, Renkonen R, Tervo T. Leukocyte rolling and extravasation in surgical inflammation after mechanical and laser-induced trauma in human patients. *Exp Eye Res* 2003;77:387-90

Klyszcz T, Junger M, Jung F, Zeintl H. Cap image - a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy. *Biomed Tech* 1997;42:168-75

Koch AE, Halloran MM, Haskell CJ, Shah MR, Polverini PJ. Angiogenesis mediated by soluble forms of E-selectin and ascaris adhesion molecule-1. *Nature* 1995;376:517-9

Kohm AP, Miller SD. Role of ICAM-1 and P-selectin expression in the development and effector function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>regulatory T cells. *J Autoimmun* 2003;21:261–71

Kruglyak L. The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies. *Nat Genet* 1997;17:21-4

Kuhnle GE, J. Groh, FH. Leipfinger, W. M. Kuebler, und A. E. Goetz. Quantitative analysis of network architecture, and microhemodynamics in arteriolar vessel trees of the ventilated rabbit lung. *Int J Microcirc Clin Exp* 1993;12:313-324

Kunkel EJ, Ley K. Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice. E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo. *Circ Res* 1996;79:1196-204

Kunkel EJ, Dunne JL, Ley K. Leukocyte arrest during cytokine dependent inflammation in vivo. *J Immunol* 2000;164:3301-8

Lafyatis R, Kim SJ, Angel P, Roberts AB, Sporn MB, Karin M. Interleukin-1 stimulates and all-trans-retinoic acid inhibits collagenase gene expression through its 5' activator protein-1-binding site. *Mol Endocrinol* 1990;4:973-80

Laird PW, Zijderveld A, Linders K. Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res* 1991;19:4293

Lander ES, Botstein D. Strategies for studying heterogeneous genetic traits in humans by using a linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:7353-7

Lander ES, Botstein D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 1989;121:185-99

Lander E, Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet* 1995;11:241-7

Lasky LA. Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Annu Rev Biochem* 1995;64:113–39

Lee DM, Kiener HP, Agarwal SK, et al. Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis. *Science* 2007;315:1006–10

Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K. Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol* 1993;143:1055-62

Ley K, Bullard DC, Arbones ML, Bosse R, Vestweber D, Tedder TF, Beaudet AL. Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo. *J Exp Med* 1995;181:669-675

Ley K, Zakrzewicz A, Hanski C, Stoolman LM, Kansas GS. Sialylated O-glycans and L-selectin sequentially mediate myeloid cell rolling in vivo. *Blood* 1995;85:3727-3735

MacNaul KL, Chartrain N, Lark M, Tocci MJ, Hutchinson NI. Discoordinate expression of stromelysin, collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in rheumatoid human synovial fibroblasts. Synergistic effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha on stromelysin expression. *J Biol Chem* 1990;265:17238-45

Maeda T, Saikawa I, Hotokebuchi T, Sugioka Y, Eto M, Murakami Y, Nomoto K. Exacerbation of established collagen-induced arthritis in mice treated with an anti-T cell receptor antibody. *Arthritis Rheum* 1994;37:406-13

Manly KF, Cudmore RH, Jr., Meer JM. Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mamm Genome* 2001;12:930-2

Mathis DJ, Benoist C, Williams VE, 2nd, Kanter M, McDevitt HO. Several mechanisms can account for defective E alpha gene expression in different mouse haplotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:273-7

Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 1998;142:117-127

Mauri C, Williams RO, Walmsley M, Feldmann M. Relationship between Th1/Th2 cytokine patterns and the arthritogenic response in collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol* 1996;26:1511-8

McIndoe, R, Bohlman, B, Chi, E, Schuster, E, Lindhardt, M, and Hood, L. Localization of non-Mhc collagen-induced arthritis susceptibility loci in DBA/1j mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:2210

McKallip RJ, Do Y, Fisher MT, et al. Role of CD44 in activation-induced cell death: CD44-deficient mice exhibit enhanced T cell response to conventional and superantigens. *Int Immunol* 2002;14:1015–26

McKee Olds J, Stafford ES. On the manner of anastomosis of the hepatic and portal circulations. *John Hopkins Bull* 1930;47:176-85

- Menger MD, Steiner D, Messmer K. Microvascular ischemia/reperfusion injury in striated muscle: Significance of “no reflow“. *Am J Physiol* 1992a;263:1892-900
- Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messmer K. Microvascular ischemia/reperfusion injury in striated muscle: Significance of „reflow-paradox“. *Am J Physiol* 1992b;263:1901-6
- Menger MD, Richter S, Yamauchi JI, Vollmar B. Intravital microscopy for the study of the microcirculation in various disease states. *Ann Acad Med Singapore* 1999;28:542-56
- Moder K, Luthra HS, Kubo R, Griffiths M, David CS. Prevention of collageninduced arthritis in mice by treatment with an antibody directed against the T cell receptor alpha beta framework. *Autoimmunity* 1992;11:219-24
- Moreland LW, Koopman WJ. Infection as a cause of arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 1991;3:639-49
- Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-73
- Muir WW, Skarda RT, Sheehan W. Hemodynamic and respiratory effects of axylazine-acetylpromazine drug combination in horses. *Am J Vet Res* 1979;40:1518-22
- Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med* 1993;178:449-60
- Muller WA. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Lab Invest* 2002;82:521-33
- Muller WA. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol* 2003;24: 327-334
- Müssener A, Litton MJ, Lindroos E, Klareskog L. Cytokine production in synovial tissue of mice with collagen-induced arthritis (CIA). *Clin Exp Immunol* 1997;107:485
- Myers LK, Terato K, Seyer JM, Stuart JM, Kang AH. Characterization of a tolerogenic T cell epitope of type II collagen and its relevance to collagen-induced arthritis. *J Immunol* 1992; 149:1439-43
- Nemazee D, Hogquist KA. Antigen receptor selection by editing or downregulation of V(D)J recombination. *Curr Opin Immunol* 2003;15:182-9
- Nolte D, Schmid P, Jäger U, Botzlar A, Roesken F, Hecht R, Uhl E, Messmer K, Vestweber D. Leukocyte rolling in venules of striated muscle and skin is mediated by PSelectin, not by L-Selectin. *Am J Physiol* 1994;267:1637-42
- Nossal GJ. Negative selection of lymphocytes. *Cell* 1994;76:229-39
- Naor D, Nedvetzki S. CD44 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2003;5:105–15
- Oldstone MB. Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* 1987;50:819-20

Oldstone MB, Lewicki H, Thomas D, Tishon A, Dales S, Patterson J, Manchester M, Homann D, Naniche D, Holz A. Measles virus infection in a transgenic model: virus-induced immunosuppression and central nervous system disease. *Cell* 1999;98:629-40

Osman GE, Hannibal MC, Anderson JP, Lasky SR, Ladiges WC, Hood L. FVB/N (H2q) mouse is resistant to arthritis induction and exhibits a genomic deletion of T-cell receptor V beta gene segments. *Immunogenetics* 1999;49:851-9

Persidis A. Autoimmune disease drug discovery. *Nat Biotechnol* 1999;17:1038

Plows D, Kontogeorgos G, Kollias G. Mice Lacking Mature T and B Lymphocytes Develop Arthritic Lesions after Immunization with Type II Collagen. *J Immunol* 1999;162:1018

Plumb DC. Veterinary Drug Handbook. *Can Vet J* 2003;297

Puré E, Cuff CA. A crucial role for CD44 in inflammation. *Trends Mol Med* 2001;7:213-21

Ridley MG, Kingsley G, Pitzalis C, Panayi GS. Monocyte activation in rheumatoid arthritis: evidence for in situ activation and differentiation in joints. *Brit J Rheumatol* 1990;29:84

Robey E, Fowlkes BJ. Selective events in T cell development. *Annu Rev Immunol* 1994;12:675-705

Rosloniec EF, Brand DD, Myers LK, Whittington KB, Gumanovskaya M, Zaller DM, et al. An HLA-DR1 transgene confers susceptibility to collagen-induced arthritis elicited with human type II collagen. *J Exp Med* 1997;185:1113-22

Rosloniec EF, Brand DD, Myers LK, Esaki Y, Whittington KB, Zaller DM, et al. Induction of autoimmune arthritis in HLA-DR4 (DRB1\*0401) transgenic mice by immunization with human and bovine type II collagen. *J Immunol* 1998;160:2573-8

Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, et al. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarised T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 1998;187:875-83

Saumet JL, Dittmar A, Leftheriotis G. Non-invasive measurement of skin blood flow: comparison between plethysmography, laser-Doppler flowmeter and heat thermal clearance method. *Int J Microcirc Clin Exp* 1986;5:73-83

Schenkel AR, Mamdouh Z, Chen X, Liebman RM, Muller WA. CD99 plays a major role in the migration of monocytes through endothelial junctions. *Nat Immunol* 2002;3:143-150

Schmitt-Sody M, Metz P, Klose A, Gottschalk O, Zysk S, Hausdorf J, Veihelmann A, Jansson V. In vivo interactions of platelets and leukocytes with the endothelium in murine antigen-induced arthritis: the role of P-selectin. *Scand J Rheumatol* 2007;36:311-9

Schmitt-Sody M, Metz P, Gottschalk O, Birkenmaier C, Zysk S, Veihelmann A, Jansson V. Platelet P-selectin is significantly involved in leukocyte-endothelial cell interaction in murine antigen-induced arthritis. *Platelets* 2007;18:365-72

Schonthal A, Herrlich P, Rahmsdorf HJ, Ponta H. Requirement for fos gene expression in the transcriptional activation of collagenase by other oncogenes and phorbol esters. *Cell* 1988;54:325-34

Sehnert B, Gierer P, Ibrahim S, Kühl A, Voll R, Nandakumar KS, Holmdahl R, Hallmann R, Vollmar B, Burkhardt H. Modulation of granulocyte-endothelium interactions by antileukoprotease: inhibition of anti-type II collagen antibody-induced leukocyte attachment to the synovial endothelium. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R95

Seki N, sudo Y, Yoshioka T, Sugihara S, Fujitsu T, Sakuma S, Ogawa T, Hamaoka T, Senoh H, Fujiwara H. Type II collagen-induced murine arthritis. Induction and perpetuation of arthritis require synergy between humoral and cell-mediated immunity. *J Immunol* 1988;140:1477-84

Shiina K, Gohda T, Murakoshi M, Yamada K, Aoki T, Yamazaki T, Tanimoto M, Tomino Y. M-cadherin, a candidate gene for type 2 diabetes and related phenotypes in a KK/Ta mouse model. *Acta Diabetol* 2007;44:6-13

Silman AJ, MacGregor AJ, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A, et al. Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Brit J Rheumatol* 1993;32:903-7

Spector TD, Roman E, Silman AJ. The pill, parity, and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1990;33:782

Spinella DG, Jeffers JR, Reife RA, Stuart JM. The role of C5 and T-cell receptor Vb genes in susceptibility to collagen-induced arthritis. *Immunogenetics* 1991;34:23-7

Sprengt and Webb. Intrathymic and extrathymic clonal deletion of T cells. *Curr Opin Immunol* 1995;7:196-205

Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990;346:425-34

Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;76:301-14

Stanley P, Bates PA, Harvey J, Bennett RI, Hogg N. Integrin LFA-1 alpha subunit contains an ICAM-1 binding site in domains V und VI. *EMBO J* 1994;13:790-1798

Stasiuk LM, Abehsira-Amar O, Fournier C. Collagen-induced arthritis in DBA/1 mice: Cytokine gene activation following immunization with type II collagen. *Cell Immunol* 1996;173:269

Stastny P. Mixed lymphocyte cultures in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1976;57:1148-57

Stastny P. Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 1978;298:869-71

Steinbauer M, Harris AG, Messmer K. Effects of dextran on microvascular ischemiareperfusion injury in striated muscle. *Am J Physiol* 1997;272:1710-6

Steinhausen M, Zimmerhackl B, Thederan H, Dussel R, Parekh N, Eßlinger H-U, von Hagens G, Komitowski D, Dallenbach FD. Intraglomerular microcirculation: Measurements of single glomerular loop flow in rats. *Kidney Int* 1981;20:230-9

Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF. A platelet alpha- granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *J Cell Biol* 1985;101:880-6

Storgrd CM, Stupnack DG, Jonczyk A, Goodman SL, Fox RI, Cheresch DA. Decreased angiogenesis and arthritic disease in rabbits treated with an alphavbeta3 antagonist. *J Clin Invest* 1999;103:47-54

Stoop R, Gál I, Glant TT, et al. Trafficking of CD44-deficient murine lymphocytes under normal and inflammatory conditions. *Eur J Immunol* 2002;32:2532-42

Stuart JM, Cremer MA, Kang AH, Townes AS. Collagen-induced arthritis in rats. Evaluation of early immunologic events. *Arthritis Rheum* 1979;22:1344-51

Stuart JM, Townes AS, Kang AH. Type II collagen-induced arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 1985;460:355-62

Steere AC. Lyme disease. *N Engl J Med* 2001;345:115-25

Steere AC, Gross D, Meyer AL, Huber BT. Autoimmune mechanisms in antibiotic treatment-resistant Lyme arthritis. *J Autoimmun* 2001;16:263-8

Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhira S, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Nakayama-Hamada M, Kawaida R, Ono M, Ohtsuki M, Furukawa H, Yoshino S, Yukioka M, Tohma S, Matsubara T, Wakitani S, Teshima R, Nishioka Y, Sekine A, Iida A, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y, Yamamoto K. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nature Genetics* 2003;34:395

Szanto S, Gal I, Gonda A, Glant TT, Mikecz K. Expression of L-selectin, but not CD44, is required for early neutrophil extravasation in antigen-induced arthritis. *J Immunol* 2004;172:6723-34

Symmons DP, Bankhead CR, Harrison BJ, Brennan P, Barrett EM, Scott DG, et al. Blood transfusion, smoking, and obesity as risk factors for the development of rheumatoid arthritis: results from a primary care-based incident case-control study in Norfolk, England. *Arthritis Rheum* 1997;40:1955-61

Tada Y, Ho A, Koh DR, Mak TW. Collagen-induced arthritis in CD4- or CD8-deficient mice: CD8+ T cells play a role in initiation and regulate recovery phase of collagen-induced arthritis. *J Immunol* 1996;156:4520

Tak PP, Thurkow EW, Daha MR, Kluin PM, Smeets TJM, Meinders AE, Breedveld FC. Expression of adhesion molecules in early rheumatoid synovial tissue. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;77:236-42

Takeichi M. Cadherins: a molecular family important in selective cell–cell adhesion. *Annu Rev Biochem* 1990;59:237–52

Terato K, Arai H, Shimozuru Y, Fukuda T, Tanaka H, Watanabe H, et al. Sex-linked differences in susceptibility of cynomolgus monkeys to type II collagen-induced arthritis. Evidence that epitope-specific immune suppression is involved in the regulation of type II collagen autoantibody formation. *Arthritis Rheum* 1989;32:748-58

Tillmanns H, Neumann FJ, Tiefenbacher C, Dorigo O, Parekh N, Waas W, Zimmermann R, Steinhausen M, Kuebler W. Activation of neutrophils in the microvasculature of the ischaemic and reperfused myocardium. *Eur Heart J* 1993;14:82-6

Tokuhiro S, Yamada R, Chang X, Suzuki A, Kochi Y, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Ohtsuki M, Ono M, Furukawa H, Nagashima M, Yoshino S, Mabuchi A, Sekine A, Saito S, Takahashi A, Tsunoda T, Nakamura Y, Yamamoto K. An intronic SNP in a RUNX1 binding site of SLC22A4, encoding an organic cation transporter, is associated with rheumatoid arthritis. *Nature Genetics* 2003;35:341

Trabandt A, Aicher WK, Gay RE, Sukhatme VP, Nilson-Hamilton M, Hamilton RT, et al. Expression of the collagenolytic and Ras-induced cysteine proteinase cathepsin L and proliferation-associated oncogenes in synovial cells of MRL/I mice and patients with rheumatoid arthritis. *Matrix* 1990;10:349-61

Trabandt A, Aicher WK, Gay RE, Sukhatme VP, Fassbender HG, Gay S. Spontaneous expression of immediately-early response genes c-fos and egr-1 in collagenase-producing rheumatoid synovial fibroblasts. *Rheumatol Int* 1992a;12:53-9

Trabandt A, Gay RE, Gay S. Oncogene activation in rheumatoid synovium. *Apmis* 1992b; 100:861-75

Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II Collagen: An Experimental Model Of Arthritis. *J Exp Med* 1977;146:857-868

Valencia X, Higgins JM, Kiener HP, et al. Cadherin-11 provides specific cellular adhesion between fibroblast-like synoviocytes. *J Exp Med* 2004;200:1673–9

van der Heijden IM, Wilbrink B, Tchetverikov I, Schrijver IA, Schouls LM, Hazenberg MP, et al. Presence of bacterial DNA and bacterial peptidoglycans in joints of patients with rheumatoid arthritis and other arthritides. *Arthritis Rheum* 2000;43:593-8

Vaporciyan AA, DeLisser HM, Yan HC, Mendiguren II, Thom SR, Jones ML, Ward PA, Albelda SM. Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. *Science* 1993;262:1580-1582

Veale DJ, Maple C, Kirk G, McLaren M, Belch JJ. Soluble cell adhesion molecules—P-selectin and ICAM-1, and disease activity in patients receiving sulphasalazine for active rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 1998;27:296-9

Veihelmann A, Szczesny G, Nolte D, Krombach F, Refior HJ, Messmer K. A novel model for the study of microcirculation in the mouse knee joint in vivo. *Res Exp Med* 1998;198:43-54



- Veihelmann A, Harris AG, Krombach F, Schütze E, Refior HJ, Messmer K. In vivo assesment of synovial microcirculation and leukocyte-endothelial cell interaction in mouse Antigen-induced arthritis. *Microcirculation* 1999;6:281-90
- Vestweber D, Blanks JE. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol Rev* 1999;79:181–213
- Villringer A, Haberl RL, Dirnagl U, Anneser F, Verst M, Einhüpl KM. Confocal laser microscopy to study microcirculation on the rat brain surface in vivo. *Brain Res* 1989;504:159-60
- Villringer A, Dirnagl U, Them A, Schürer L, Krombach F, Einhüpl KM. Imaging of leukocytes within the rat brain cortex in vivo. *Microvasc Res* 1991;42:305-15
- Vollmar B, Conzen PF, Kerner T, Habazettl H, Vierl M, Waldner H, Peter K. Blood flow and tissue oxygen pressures of liver and pancreas in rats: effects of volatile anesthetics and of hemorrhage. *Anesth Analg* 1992;75:421-30
- Vollmar B, Lang G, Post S, Menger MD, Messmer K. Microcirculation of the liver in hemorrhagic shock in the rat and its significance for energy metabolism and function. *Zentralbl Chir* 1993;118:218-25
- Vollmar B, Preissler G, Menger MD. Hemorrhagic hypotension induces arteriolar vasomotion and intermittent capillary perfusion in rat pancreas. *Am J Physiol* 1994;267:1936-40
- Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant for liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol* 1994b;145:1421-31
- Vollmar B, Conzen P, Habazettl H, Adili F, Peter K: Does nitrous oxide affect coronary microcirculation? An intravital microscopic study in the canine heart. *Anesth Analg* 1995;80:249-55
- Vollmar B, Rüttinger D, Wanner GA, Leiderer R, Menger MD. Modulation of Kupffer cell activity by gadolinium chloride in endotoxemic rats. *Schock* 1996;6:434-41
- Von Andrian UH, Arfors KE. Neutrophil-endothelial cell interaction in vivo: a chain of events characterized by distinct molecular mechanisms. *Agents Actions Suppl* 1993;41:153-64
- Wahl SM.. Transforming growth factor beta: the good, the bad, and the ugly. *J Exp Med* 1994;180:1587-90
- Wang Y, Kristan J, Hao L, Lenkoski CS, Shen Y, Matis LA. A role for complement in antibody-mediated inflammation: C5-deficient DBA/1 mice are resistant to collagen-induced arthritis. *J Immunol* 2000;164:4340
- Weber JL, May PE. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 1989;44:388-96
- Weber C. Novel mechanistic concepts for the control of leukocyte transmigration: specialization of integrins, chemokines, and junctional molecules. *J Mol Med* 2003;81:4-19

Weber JL, Wong C. Mutation of human short tandem repeats. *Hum Mol Genet* 1993;2(8):1123-8

Wooley PH, Luthra HS, Stuart JM, David CS. Type II collagen-induced arthritis in mice. Major histocompatibility complex (I region) linkage and antibody correlates. *J Exp Med* 1981;54:688-700

Wright M. Pharmacologic effects of ketamine and its use in veterinary medicine. *J Am Vet Med Assoc* 1982;180:1462-71

Yang H-T, Jirholt J, Svennsson L, Sundvall M, Jansson L, Pettersson U, et al. Identification of genes controlling collagen-induced arthritis in mice: striking homology with susceptibility loci previously identified in the rat. *J Immunol* 1999;163:2916-2921

Yoo TJ, Kim SY, Stuart JM, Floyd RA, Olson GA, Cremer MA, Kang AH. Induction of arthritis in monkeys by immunization with type II collagen. *J Exp Med* 1988;168:777-82

Yu X, Bauer K, Koczan D, et al. Combining global genome and transcriptome approaches to identify the candidate genes of small-effect quantitative trait loci in collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 2007;9:R3

Zahler S, Heindl B, Becker BF. Ketamine does not inhibit inflammatory responses of cultured human endothelial cells but reduces chemotactic activation of neutrophils. *Acta Anaesthesiol Scand* 1999;43:1011-26

Zwissler B, Schosser R, Weiss C, Iber V, Weiss M, Schwickert C, Spengler P, Messmer K. Methodological error and spatial variability of organ blood flow measurements using radiolabeled microspheres. *Res Exp Med* 1991;191:47-63

## DANKSAGUNG

An erster Stelle danke ich recht herzlich Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar, Direktorin des Instituts für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock, für die Bereitstellung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung der vorliegenden Promotion, und die großzügige Unterstützung zu jeder Zeit.

Nach Beendigung der Arbeit gilt mein besonderer Dank:

Herrn Dr. med. Philip Gierer für die Aufnahme in das Team und die Einarbeitung in die mikrochirurgischen Techniken und in die Methode der Intravitalmikroskopie.

Frau Dr. oec. troph. Hoang Tu-Rapp für die Einführung in die Welt der Molekularbiologie und Immunogenetik, die eine sehr gute Unterstützung in jeder Hinsicht während der gesamten Doktorarbeit war.

Herrn Dr. Saleh M. Ibrahim für das in mich gesetzte Vertrauen und seine unersetzliche Hilfe bei der Durchführung der Arbeit.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Ilona Klamfuß für ihre exzellente Arbeit in der Zentralen Tierhaltung, ihre ständige Hilfsbereitschaft und die Unterstützung bei zahlreichen Tierexperimenten.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Chirurgie für Ihre freundliche und angenehme Arbeitsatmosphäre und stetige Hilfsbereitschaft.

Mein größter Dank gilt meinem Mann Xiafu Wang und meiner Familie. Ich danke Euch für Eure grenzenlose Unterstützung in allen Lebenslagen, Euer Verständnis, für Euren Glauben an mich und Eure Liebe.

Liyang Pu

## ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Diese Arbeit wurde an keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung eingereicht.

Liyong Pu

## Thesen zur Dissertation

1. Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch-entzündliche Systemerkrankung. Aufgrund einer hohen Prävalenz von ca. 1% hat die RA infolge ihrer enormen Kosten, die für Diagnose, Therapie, Rehabilitationsmaßnahmen sowie Arbeitsausfälle aufgewendet werden müssen, eine enorme volkswirtschaftliche Bedeutung.
2. Die Ätiologie und Pathogenese der Erkrankung sind trotz intensiver Forschung weitgehend ungeklärt. Eine multifaktorielle Genese wird vermutet. Neben diversen Umweltfaktoren wird eine zur Krankheitsdisposition beitragende genetische Komponente diskutiert.
3. Pathogenetisch ist die RA durch eine chronische Entzündung der Synovialmembran charakterisiert. Die Aktivierung von zirkulierenden Leukozyten und ihre Interaktion mit dem Endothel mit anschließender transendothelialer Migration und Infiltration der Leukozyten ins Gewebe ist der erste und entscheidende Schritt in einer komplexen Kaskade von Prozessen der Gewebeschädigung.
4. Die initiale Phase der Arthritisentwicklung und hierbei insbesondere die Leukozytenrekrutierung sind bisher unzureichend untersucht. Ein besseres detailliertes Verständnis zur Initiation der RA ist die Voraussetzung für die Entwicklung neuer effizienter Therapieansätze.
5. Durch die Heterogenität der humanen Population und erhebliche Variabilität an Umweltfaktoren wird die Forschung zur Erklärung der kausalen Zusammenhänge und der exakten Pathogenese der RA behindert. Der Einsatz von dem Inzuchtmodell bietet zur weiteren genetischen Untersuchung dieser polygenen Erkrankung eine neue hervorragende Möglichkeit.
6. Die Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) ist hinsichtlich der klinischen und histopathologischen Veränderungen bei humaner rheumatoider Arthritis ein sehr ähnliches Modell.
7. Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie (IVM) ist eine etablierte Methode zur Visualisierung und Analyse der synovialen Mikrozirkulation des Kniegelenkes. Sie ermöglicht die quantitative Beurteilung der mikrohämodynamischen Parameter und der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion während der frühen Entwicklungsphase der RA.
8. Um die genetischen Faktoren zu identifizieren, welche in die Ätiologie und den Pathomechanismus der CIA involviert sind, wird eine genomweite Kopplungsanalyse

mit 155 Mäusen einer F2-Generation aus der Kreuzung des Arthritis-suszeptiblen DBA/1J und des Arthritis-resistenten FVB/N-Stammes durchgeführt.

9. Es wurden 7 chromosomale Regionen (quantitative trait loci- QTL's) identifiziert, welche verschiedene in vivo Parameter (Fraktion rollender Leukozyten, adhärente Leukozyten, funktionelle kapillare Dichte, kapillarer Diameter, Erythrozyten-fließgeschwindigkeit) der CIA kontrollieren. Alle detektierten Loci wurden neu beschrieben und waren bislang nicht bekannt.
10. Zudem wurden mehrere QTL's identifiziert, welche die Expression von selektiven Genen kontrollieren, die potentiell an der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion im frühen Stadium der Arthritis beteiligt sind.
11. Diese Arbeit ist nach unserer Kenntnis die erste Studie, die die QTL's, welche die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in der Frühphase der Kollagen-induzierten Arthritis kontrollieren, beschreibt.